



TITLE:

植物型レクチンの特異な高次構造 と多機能発現機構に関する蛋白質 工学的研究

AUTHOR(S):

畑, 安雄

CITATION:

畑, 安雄. 植物型レクチンの特異な高次構造と多機能発現機構に関する
蛋白質工学的研究. 2004

ISSUE DATE:

2004-03

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/78019>

RIGHT:

学術雑誌掲載論文の抜き刷り、出版社に著作権許諾が得られていない
ため未掲載。

植物型レクチンの特異な高次構造と多機能
発現機構に関する蛋白質工学的研究

(研究課題番号 14560065)

平成14年度～平成15年度科学研究費補助金(基盤研究(C)(2))

研究成果報告書

平成16年3月

研究代表者 畑 安 雄

(京都大学化学研究所 教授)

植物型レクチンの特異な高次構造と多機能
発現機構に関する蛋白質工学的研究

(研究課題番号 14560065)

平成14年度～平成15年度科学研究費補助金(基盤研究(C)(2))

研究成果報告書

平成16年3月

研究代表者 畑 安 雄

(京都大学化学研究所 教授)

は し が き

レクチンとは、赤血球や糖質複合体などを凝集させる糖結合タンパク質の総称であり、特に糖鎖結合部位を少なくとも2つ以上もつものとされている。レクチンはこれまでに植物、細菌、哺乳動物など生物界において広く見出されているが、赤血球凝集活性の他にも、アポトーシス誘導、免疫グロブリン産生調節、がん細胞特異的凝集活性など、種によって様々な機能を発揮している。これらレクチンの生理活性の中で最も画期的なものの一つにリンパ球との反応があげられる。生体外でリンパ球をレクチンとともに培養するとリンパ球が分裂し増殖する。レクチンのこのような活性はマイトジェン活性と呼ばれ、異物すなわち抗原に対する生体の免疫応答の鍵となる重要な現象であると考えられている。しかし、細胞膜を通して DNA 合成を開始させリンパ球の分裂に至る細胞内プロセスをレクチンがどのように開始させるのかについては、未だ理解されていない。本研究では、マイトジェン活性を発揮する数少ないレクチンであるアメリカヤマゴボウ根茎由来レクチン (pokeweed lectine, PL) を対象として X 線結晶構造解析の手法を用いて一連の PL 分子の構造解析を行い、得られた構造を比較することによって赤血球凝集活性およびマイトジェン活性能を制御する構造基盤を明らかにすることを研究の第一目的とした。

PL は、N-アセチルグルコサミンが β -1,4 グリコシド結合でつながった直鎖の多糖であるキチンに特異的に結合する。キチンは、植物には存在せず細菌の細胞壁成分であることから、PL は生体防御タンパク質であると考えられている。これまでにアメリカヤマゴボウ根茎から PL-A, PL-B, PL-C, PL-D1 および PL-D2 と名付けられた5種類のレクチンが単離、精製されている。これら PL 分子は、キチン結合タンパク質に共通したキチン結合ドメインと呼ばれる40残基程度のドメインの繰り返しから構成されていることが明らかとなっている。本研究では、5種の PL 分子の

うち PL-C、PL-D1、PL-D2 および PL-D2 糖鎖複合体の結晶構造を解析することにより赤血球凝集活性およびマイトジェン活性を制御する構造基盤を明らかにすると共に PL-C の特異な二量体構造と活性の関係についても明らかにした。更に PL-C 二量体の分子内タンパク質間相互作用と PL-D2 糖鎖複体内に観られるタンパク質-糖鎖間相互作用の類似性に関する構造情報も明らかにすることができた。

一般に、タンパク質は生体中でタンパク質・核酸・糖鎖など種々の物質と相互作用しながら機能している。これら相互作用の正確な理解がタンパク質機能の人工制御のうえで不可欠なことは十分認識され、これを指向した研究が各分野で行われている。レクチンや細胞表面上の糖特異性リセプターなどの糖結合タンパク質研究の分野においてもそうで、新規治療薬創製のためにタンパク質-糖鎖間相互作用の知識を基に糖鎖阻害剤開発研究が活発に行われてきた。しかし、複雑な糖鎖リガンド合成には時間がかかる割に低収量のステップが多く、オリゴ糖の化学合成はモノマーの保護基付加および脱離と会合や生成物の位置化学制御および立体化学制御に洗練された戦略が必要である。また、酵素を利用した糖鎖合成はこれら化学合成の持つ弱点をクリアするかも知れないけれども特異酵素利用の点で制限がある。そこで、糖結合タンパク質に結合する高親和性ペプチドの開発が注目され、有用ペプチドリガンドの開発戦略が考え出されるようになってきた。そして、これまでに経験的知識に基づいて合成された幾つかのペプチドのレクチン阻害効果が検証されたとの報告がある。しかしながら、このタンパク質間相互作用とタンパク質-糖鎖間相互作用の類似性に関する構造情報がほとんど無かったために効率的な阻害剤あるいは機能制御剤の合成には至っていないのが実情である。

本研究で得られた相互作用の類似性に関する構造情報は、レクチン機能のペプチド性制御剤合成の分野に効率的な戦略を提供しこの分野の研究を活発化させるうえで多大な貢献をするものと予想される。今後、同様な研究がますます盛んに行われ、この種の構造情報量が増えてきて、効力を発揮する有用な活性制御剤創製へとつな

がって行く事が期待されている。

研究組織

研究代表者 : 畑 安 雄 (京都大学化学研究所・教授)

交付決定額 (配分額)

	直接経費
平成14年度	2, 0 0 0 千円
平成15年度	1, 4 0 0
総 計	3, 4 0 0

研究発表

[1] 学会誌等

(1) Hata Y., Fujii T., Hayashida M., Aso Y. and Ishiguro M.

Crystal Structures of Three Lectins from the Roots of Pokeweed

Acta Crystallogr. **A58**, (Supplement), C292 (2003)

(2) Hayashida M., Fujii, T., Hamasu, M., Ishiguro, M. and Hata Y.

Crystallization and Preliminary X-ray Analysis of Lectin C from the Roots of

Pokeweed (*Phytolacca americana*)

Acta Crystallogr. **D59**, 1249-1252 (2003)

(3) Hayashida M., Fujii, T., Ishiguro, M. and Hata Y.

Similarity between the Protein-Protein and Protein-Carbohydrate Interactions

Revealed by Two Crystal Structures of Lectins from the Roots of Pokeweed.

J. Mol. Biol. **334**, 551-565 (2003)

(4) Fujii, T., Hayashida, M., Hamasu, M., Ishiguro, M. and Hata, Y.

Crystal Structure of Two Lectins from the Roots of Pokeweed (*Phytolacca americana*)

Acta Crystallogr. **D60**, 665-673 (2004)

[2] 口頭発表

(1) 畑 安雄、藤井知実、林田 稔、水田悟史、濱洲三加、麻生陽一、石黒正恒

アメリカヤマゴボウ由来レクチンの立体構造解析

日本農芸化学会 平成14年3月26日

(2) 藤井知実、林田 稔、濱洲三加、水田悟史、麻生陽一、石黒正恒、畑 安雄

アメリカヤマゴボウ根茎由来レクチンの結晶構造

日本生化学会 平成14年10月16日

(3) 林田 稔、藤井知実、石黒正恒、畑 安雄

アメリカヤマゴボウ根茎由来レクチンの X 線結晶構造

日本結晶学会 平成14年12月11日

(4) 林田 稔、藤井知実、石黒正恒、畑 安雄

レクチンにおけるタンパク質間およびタンパク質-糖鎖間相互作用の類似性

日本蛋白質科学会 平成15年6月25日

研究成果による工業所有権の出願・取得

発 明 の 名 称 : レクチンの結晶

発 明 者 : 畑 安雄 藤井知実

権 利 者 名 : 日本国

工業所有権の種類 : 特許

番 号 : 特願2003—398264

出 願 年 月 日 : 平成15年11月27日

植物型レクチンの特異な高次構造と多機能
発現機構に関する蛋白質工学的研究

本 文

目 次

略語一覧	9
第一章 序論	10
第二章 PL-C の X 線結晶構造解析	
緒言	21
実験方法および実験結果	22
1. 結晶調製	22
1.1. tetragonal 結晶	23
1.1.1. 結晶化	23
1.1.2. 結晶学的パラメータの決定	23
1.1.3. 回折強度測定	26
1.2. rhombohedral 結晶	27
1.2.1. 結晶化	27
1.2.2. 結晶学的パラメータの決定	28
1.2.3. 回折強度測定	29
2. 双晶	30
2.1. 双晶について	30
2.2. 双晶の評価方法	32
2.3. 双晶の判定	32
3. 単結晶	39
3.1. 結晶化条件の改善	39
3.2. 結晶学的パラメータの決定	42
3.3. 回折強度測定	43

3.4. 重原子誘導体結晶の調製	44
3.5. 重原子誘導体の回折強度測定	46
4. 構造解析	48
4.1. 位相の決定	48
4.2. 分子構造モデルの構築および精密化	50
考察	52
1. 電子密度図の質および分子構造モデルの信頼性	52
2. ドメイン構造	55
3. PL-C 二量体構造	57
4. 分子内対称からのずれ	60
5. 糖鎖結合における二量体構造の必然性	61
第三章 PL-Ds の X 線結晶構造解析	
緒言	65
実験方法および結果	66
1. PL-D1	66
1.1. 結晶化	66
1.2. 結晶学的パラメータの決定	67
1.3. 回折強度測定	68
1.4. 構造解析および精密化	69
2. PL-D2	72
2.1. 結晶化	72
2.2. 結晶学的パラメータの決定	73
2.3. 回折強度測定	74
2.4. 構造解析および精密化	75

3. PL-D2 糖鎖複合体	76
3.1. 結晶化	76
3.2. 結晶学的パラメータの決定	77
3.3. 回折強度測定	78
3.4. 構造解析および精密化	79
考察	82
1. 電子密度図の質および分子構造モデルの信頼性	82
1.1. PL-D1	82
1.2. PL-D2	82
1.3. PL-D2 糖鎖複合体	83
2. 全体構造および結晶パッキング	85
2.1. PL-D1 および糖鎖非結合型 PL-D2	85
2.2. PL-D2 糖鎖複合体	87
3. カルシウム結合部位	90
4. ドメイン構造および糖鎖結合部位の剛体性	91
5. 分子内ドメイン間の柔軟性	93
6. PL-D1 と PL-D2 の構造比較	96
7. 糖鎖-タンパク質間相互作用	97
8. 糖鎖の結合方向性	101
9. タンパク質間および糖鎖タンパク質間相互作用の類似性	102
第四章 総括	107
参考文献	112
発表論文の別刷と口頭発表の要旨	124

略 語 一 覽

AS	anomalous scattering
ano	anomalous
CCD	charge coupled device
CGLS	conjugate gradient least square
<i>F</i>	structure factor
FOM	figure of merit
<i>I</i>	diffraction intensity
IP	imaging plate
iso	isomorphous
MIR	multiple isomorphous replacement
NMR	nuclear magnetic resonance
PDB	Protein Data Bank
PL	pokeweed lectin
RCSB	Reasearch Collaboratory for Structural Bioinformatics
R-AXIS	Rigaku automated X-ray imaging system
<i>R</i> -factor	reliability factor
r.m.s.d.	root-mean-square deviation
SIR	single isomorphous replacement
SA	simulated annealing
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
UDA	<i>Urtica dioica</i> agglutinin
WGA	wheat germ agglutinin

第一章 序論

本研究で対象としたレクチンは、約 100 年以上前に赤血球を凝集させる物質として発見された。ヒトや動物の赤血球を凝集するタンパク質が植物中に存在することの最初の報告は、1888 年の Stillmark の博士論文である。その後、種々の植物種子からの抽出物がいろいろな動物の赤血球を凝集するという事実が次々と明らかになり、最初レクチンは“血球凝集素”、あるいはもっと一般的に“植物凝集素”と呼ばれていた (Sharon & Lis, 1990)。Boyd と Renkonen は、植物抽出液の血液型特異的凝集活性を 1948 年と 1949 年に独立して報告した。1953 年、Morgan と Watkins は、植物由来血液型特異的凝集素の凝集活性が特異的な糖で阻害されることからある一定の糖構造が血液型の決定基であると報告した。1954 年に Boyd と Schpleigh は、植物凝集素が血液型特異性をもつこと、すなわち糖鎖構造を見分けることから、ラテン語の “legere (選び出す)” にちなんで、これをレクチンと呼ぶことを提唱した。このように初めは主として植物種子中のレクチンを中心に研究が進められてきたが、1970 年代以降、レクチンの細胞生物学的応用についての関心が高まり、植物以外に、細菌、カビ、軟体動物、魚類の血清、哺乳動物の組織からもレクチン様の糖結合性タンパク質が多数見出されるようになった。また、レクチンは、赤血球だけでなく、リンパ球、繊維芽細胞、精子、細菌、菌類のような細胞も凝集させることが発見されてきた。そこで、1980 年代 Goldstein らは、レクチンを次のように定義することを提唱した (Liener *et al.*, 1986) 「レクチンとは、動植物あるいは細菌で見いだされる糖結合性タンパク質で、結合価が二価以上で動植物細胞を凝集し、多糖類や複合糖質を沈降させ、その結合特異性は単糖やオリゴ糖を用いた阻止試験で規定することができるものでなくてはならない。」この定義に従えば、糖鎖と結合するが、糖質複合体沈降能や細胞凝集活性をもたない、いわゆる単価の結合タン

パク質はレクチンと呼べないことになる。しかしながら、タンパク質の一次構造および三次構造の情報が著しく増えてきた近年、Goldstein らの定義では当てはまらないようなレクチン様のタンパク質が数多く見出されてきており、糖結合能や凝集活性に関係なく立体構造に基づいてレクチンのグループに分類されるものも増えてきている。一般には、特にこだわらない限り、レクチンという術語は Goldstein らの定義に従って用いられており、本報告書中においてもこれに従うことにした。

植物レクチンは、その一次構造および立体構造から、マメ科種子レクチン、キチン特異的イネ科レクチン、マンノース特異的ヒガンバナ科球根レクチンおよびガラクトース特異的リシンファミリーの 4 群に分類されている (Yamamoto, 1994; Drickamer, 1995)。

マメ科種子レクチンは、コンカナバリン A (Con A; Concanavalin A) を代表に、約 70 種以上知られ、植物レクチンの中で最もよく研究されている (Sharon & Lis, 1990)。この種のレクチンは、糖特異性においてバラエティーに富んでいるが、いずれも約 260 アミノ酸から構成され、一次構造の保存性は高く、立体構造は β -ストランドに富むという点で共通している。

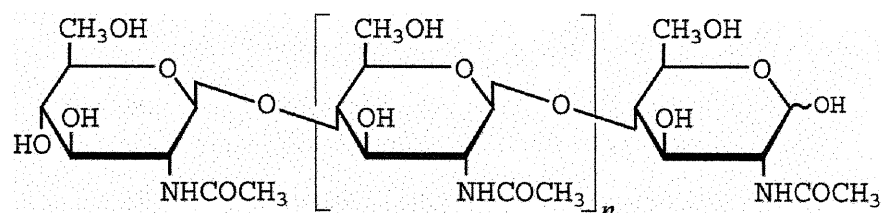


図 1.1 キチン (β -1,4-poly-*N*-acetylglucosamine)

N-アセチルグルコサミンが β (1-4)グリコシド結合でつながった直鎖の多糖であるキチン (図 1.1) に特異的に結合するイネ科レクチンは、保存された 4 個のジスルフィド結合を形成する 8 個のシステイン残基とグリシン残基に富んだ 40 残基程度のアミノ酸からなる共通のモチーフをもつ (図 1.2)。Raikhel らは、このポリペ

プチドモチーフをキチン結合ドメインと称した (Raikhel & Lee, 1993)。イネ科レクチンで最もよく研究されているコムギ胚芽凝集素 (WGA; wheat germ agglutinin) は、キチン結合ドメインの4回繰り返し構造からなるサブユニットのホモ二量体で、シアル酸にも結合することが知られている (Nagata & Burger, 1974; Monsigny *et al.*, 1980; Wright, 1980; Wright & Jaeger, 1993)。また、1つのキチン結合ドメインからなるゴムの木由来 Hevein、2つのキチン結合ドメインの繰り返しからなるイラクサ由来アグルチニン (UDA; *Urtica dioica* agglutinin) が知られている。

PL-B	I	1	APECGREASGKVPDD-LCCSVFGHCGVSVQHCGDG--CQSQ-CVT-N---	43			
	II	44	WRCGKDFDDRTCPKKLLCCSKDGCNTDAHC GEG--CQSQ-CEQYN---	87			
	III	88	WRCGVDFGNRTC PND-LCCSVGGWCGTTDDHC GEG--CQSQ-CEQYN---	130			
	IV	131	WHCGVDFGNRTC PND-LCCSEWGWCGITEGYCGEG--CQSQ-CN H-----	171			
	V	172	ORCGKDFAGRTC LND-LCCSEWGWCGSSEAHCGQG--CQSN-CN-Y----	212			
	VI	213	NRCGRNFGFRTC PNE-LCCSSGGWCGSNDACHGKG--CQSQ-CD-Y----	253			
	VII	254	WRCGVDFSGRVC PQG-RCCSAWGWCGDTEEYCEE G--CQSQ-CKLS	295			
PL-C		1	10	20	30	40	
	I	1	APVCGVRASGRVCPDG-YCCSQWGYCGTTEEYCGKG--CQSQ-CD-Y----	42			
	II	43	NRCGKEFGGKECHDE-LCCSQYGWCGNSDGHCGEG--CQSQ-CS-Y----	83			
III	84	WRCGKDFGGRLCTED-MCCSQYGWCGLTDDHCEDG--CQSQ-CDLPT	126				
PL-D2	I	1	APECGERASGKRC PNG-KCCSQWGYCGTTDNYCGQG--CQSQ-CD-Y----	42			
	II	43	WRCGRDFGGRLCEED-MCCSKYGWCGYSDDHCEDG--CQSQ-CDLT	84			
Hevein		1	EQCGRQAGGKLC PNN-LCCSQWGWCGSTDEY CSPDHNCQSN-CKD	43			
UDA-VI	I	1	ORCGSQGGGSTCPGL-RCCSIWGWCGDSEPYCGRT--CENK-CWSGERSD	46			
	II	47	HRCGAAVGNPPCGQD-RCCSVHGWCGGGNDYCSGGN-CQYR-CSSS	89			
WGA1	I	1	ORCGEQGSNMECPNN-LCCSQYGYCGMGGDYCGKG--CQNGACWTS----	43			
	II	44	KRCGSQAGGATCTNN-QCCSQYGYCGFGAEYCGAG--CQGGPCRAD----	86			
	III	87	IKCGSQAGGKLC PNN-LCCSQWGFCLGSEFCGGG--CQSGACSTD----	129			
	IV	130	KPCGKDAGGRVCTNN-YCCSKWGS CGIGPGYCGAG--CQSGGCDGD	172			

図 1.2 キチン結合タンパク質のアミノ酸配列

緑および赤の文字は、それぞれ全てのドメインに保存されているシステインおよびセリン残基を示す。黄色および青の四角で囲まれた残基は、それぞれ糖鎖の結合に関与する芳香族残基およびそれら芳香族残基を取り囲む疎水性残基あるいはかさ高い側鎖をもつ残基を示す。オレンジの四角で囲まれた残基は PL-D2 では欠如しており、それ以外では、PL-D1 と PL-D2 の一次構造は全く同じである。

これらの中で、Hevein はキチン結合能を有すが、赤血球凝集能は示さないためレクチンには分類されていない。N-アセチルグルコサミンからなるオリゴ糖に特異性を有するレクチンは、この他にもウリ科植物の篩部浸出液中に見出されているが、アミノ酸配列上でキチン結合ドメインに相当する部分は見当たらない (Anantharam *et al.*, 1986; Bostwick *et al.*, 1994)。なお、WGA には WGA1~3、また UDA にも UDA-I~VI と名付けられた幾つかのアミノ酸配列が置換したイソレクチンが存在する。両タンパク質における初期の研究では、これらのイソレクチンを分離する精製技術がなかったため、イソレクチンの混合物を用いて行われていたと考えられる。よって、本報告書中において WGA および UDA に関して言及する際、区別出来ないものあるいはそれらのイソレクチンに共通した事柄について述べる場合には、それぞれ WGA および UDA と記述し、区別できる場合にはそれに相当する番号を付けて記述した。

マンノース特異的ヒガンバナ科レクチンは、24 アミノ酸からなるドメインの 3 回繰り返した構造からなるサブユニットのホモ二量体あるいはホモ四量体である (Hester *et al.*, 1995, 1996)。

ヒマ種子由来の毒素リシンは、267 アミノ酸残基からなる RNA N-グリコシダーゼ活性をもつ A 鎖と 262 アミノ酸残基からなるガラクトース結合性レクチンの B 鎖がジスルフィド結合を介して結合した AB ヘテロ二量体であり、同種子由来の凝集素 (CBH; castor bean hemagglutinin) は、リシンと相同なヘテロ二量体が非共有的に会合した四量体で存在する (Funatsu *et al.*, 1978; Monfort *et al.*, 1987)。リシンはガラクトースおよび N-アセチルガラクトサミンに結合するが、CBH は N-アセチルガラクトサミンに結合しない²³⁾。このように、アミノ酸配列や立体構造が類似しているグループにおいてさえ、植物レクチンの糖特異性は多岐にわたる (Nicolson *et al.*, 1974)。

レクチンが発見されてから一世紀以上経つが、レクチンが著しく興味ある研究対象となってきたのはここ 20 年か 30 年のことである。その興味がもたれてきた理由として、溶液中や細胞表面上での糖の発見や研究にレクチンが非常に役立つことが挙げられる (Peacock *et al.*, 1990; Halina & Sharon, 1998)。レクチンは生物学や医学の研究上非常に貴重な道具として役立っており、その範囲は糖タンパク質や糖ペプチドの分類・確認のみならず、細胞や組織の組織化学、細胞の分化、神経細胞経路の追跡、細菌の種類の決定、骨髄移植時のリンパ球と骨髄の分類など多岐にわたっている (Liener *et al.*, 1986; Peacock *et al.*, 1990; Sharon & Lis, 1990; Halina & Sharon, 1990)。しかしながら、上に挙げたように、レクチンの研究は研究手段としての応用的研究に関するものがほとんどであり、レクチン自体の機能やその存在意義に関してはほとんど明らかにされていない。一般的に、レクチンは認識決定基としての機能をもつと考えられている (Sharon & Lis, 1990)。例えば、インフルエンザウイルスの赤血球凝集素と標的細胞表面上のシアル酸を含むレセプターとの結合を介してウイルスと細胞の相互作用が始まる (Sharon & Lis, 1990)。細菌の細胞表面レクチンやアメーバなど腸の寄生虫の細胞表面レクチンは、胃腸管や尿道中の上皮細胞とこれらの微生物とを糖特異的に付着させ、感染を容易にさせる (Sharon & Lis, 1990)。動物レクチンは、発見されて 20 年ほどになるが、受精、分化と器官形成、免疫応答など多くのプロセスに深く関わっていることが分かってきている (Sharon & Lis, 1990)。一方、レクチンの研究が始まるきっかけになった植物レクチンは、根粒細菌と植物との間の共生の媒介としての関与や、真菌の植物病原体からの保護、すなわち免疫系をもたない植物での生体防御の役割を果たしているという説があるが、今のところ明確な結論は得られていない (Sharon & Lis, 1990)。

レクチンには血液型赤血球凝集活性の他に様々な生理活性が報告されている。

早くから、レクチンが、がん細胞特異的凝集活性 (Aub *et al.*, 1963) や細胞障害活性 (Ishiguro *et al.*, 1964) などを有することは知られていたが、最近では、溶血特性 (Hatakeyama *et al.*, 1994, 1995)、アポトーシス誘導 (Kim *et al.*, 1993)、免疫グロブリン産生調節 (Lim *et al.*, 1994) などの機能が見出されており、レクチンの多機能性に注目が集まってきている。

レクチンの細胞に対する生理活性の中で、最も画期的なものの一つがリンパ球との反応である。リンパ球をレクチンとともに培養すると、リンパ球が増殖し分裂するようになる。このように静止期にあるリンパ球を、成長・増殖する状態へと導くことはマイトジェン刺激と呼ばれ、異物 (抗原) に対する生体の免疫応答の鍵となる重要な現象である。1960 年代にアカインゲンマメ種子レクチン (PHA; *Phaseolus vulgaris* agglutinin) やアメリカヤマゴボウレクチン (PL; Pokeweed lectin) のマイトジェン活性が発見されて以来、同じような活性をもつ他のレクチンが見つかってきた (Nowell, 1960; Farne *et al.*, 1964)。ほとんどが植物から発見されたものばかりであるが、中には粘菌や細菌から見つかったものもいくつかある (Sharon & Lis, 1990)。マイトジェンレクチンはリンパ球の胸腺依存性集団 (T 細胞) だけを刺激するものがほとんどであり、胸腺非依存性集団 (B 細胞) など異なるクラスのリンパ球に対して活性をもたない (Di Sabato *et al.*, 1987)。例外として、B 細胞を活性化するが T 細胞を活性化しないウミザリガニ *Homarus americanus* や粘菌 *Dictyostelium purpureum* のレクチン、T 細胞と B 細胞の両方を活性化する PL が挙げられる (Di Sabato *et al.*, 1987)。

マイトジェンレクチンの特性は、細胞の抗原特異性に関係なく活性化可能なリンパ球のほとんど (ときには、70~80%) を活性化できる点にある (Sharon & Lis, 1990; Kilpatrick, 1999)。これに対して抗原は全リンパ球数の 0.1% かそれ以下のほんの少しの特異的なクローンだけを活性化する (Sharon & Lis, 1990; Kilpatrick, 1999)。このように多数のリンパ球のクローンを活性化できるので、これらのレクチンは多

クローン性マイトジェンとして分類される。レクチンを使うとこのようにマイトジェン反応が増大するので、細胞の増殖による変化を追跡したり、研究したりするのがきわめて容易となる。

一般的に、マイトジェン作用を有するレクチンはリンパ球活性化の引き金となるチロシンリン酸化酵素の活性化、カルシウムの細胞内への流入およびイノシトールリン脂質代謝の亢進を引き起こすと考えられている (Sharon & Lis, 1990; Kilpatrick, 1999)。しかし、細胞膜を通して DNA の合成を開始させリンパ球の分裂に至る細胞内プロセスを、マイトジェンがどのように開始させるのかについては不明である。

植物レクチンである PL は、T 細胞だけでなく B 細胞に対してもマイトジェン活性を示すことからリンパ球の免疫機能を把握するための検査薬として現在繁用されている (Waxdal, 1974; Waxdal & Basham, 1974; Yokoyama *et al.*, 1976; DiSabato *et al.*, 1987; Sharon & Lis, 1990; Kilpatrick, 1999)。PL による B 細胞の活性化には、ヘルパーT 細胞が介在し、サプレッサーT 細胞がこれを抑制して B 細胞による免疫グロブリンの産生が亢進すると考えられているが、やはりその詳細については不明な点も多い。一般に PL は Pokeweed mitogen (PWM) として認知されており、その発見は 1961 年までさかのぼる。Barker と Farnes は、アメリカヤマゴボウの果実を大量に食べた小児の検死用の脳組織を観察したところ、幼若化したリンパ細胞を発見した (Farne *et al.*, 1964)。彼等は、アメリカヤマゴボウの果実、種子、緑葉、根茎いずれの器官の抽出液にもマイトジェン活性および赤血球凝集活性が存在し、特に緑葉と根茎にその強い活性を見出した。これを機にアメリカヤマゴボウレクチンの研究が始まった。1974 年、Waxdal は、アメリカヤマゴボウ根茎から 5 種類のマイトジェン (Pa-1~Pa-5) を分離・精製し、これらをイソレクチンと称した (Waxdal, 1974)。これらイソレクチンは、季節により成分比が変動することが論文

中に述べられている。Pa-1 は、イソレクチンの中で赤血球凝集活性およびマイトジェン活性が最も強く、22kDa のサブユニットが複数会合して存在することが示された。Pa-2, Pa-3, Pa-4 および Pa-5 は、31 kDa, 25 kDa, 21 kDa および 19 kDa のモノマーであり、Pa-2 は強い凝集活性をもつが、Pa-4 は凝集活性をもたないマイトジェンであることが示された。Waxdal はまた、Pa-1 のみがマウス T および B 細胞幼若化活性を示し、他のイソレクチンはマウス T 細胞のみを幼若化させること、そのうち Pa-2 が最も強い幼若化活性を示すことを見出した (Waxdal & Basham, 1974)。このように PL の研究は、その特異なマイトジェン活性に焦点が集まっていたこともあり、一次構造でさえ決定されておらず、糖鎖特異性や結合能などタンパク質化学的研究に関しては殆ど何もなされていなかった。

そのような PL の研究背景から、Yamaguchi らはアメリカヤマゴボウの根茎から PL-A, PL-B, PL-C, PL-D1 および PL-D2 と名付けられた 5 種類のレクチンを単離・精製し、その一次構造の決定と機能に関する研究を行った (Kino et al., 1995; Kimura, 1996; Yamaguchi, 1995, 1996, 1997)。その結果、これら PL 分子のアミノ酸配列は、キチン結合ドメインの繰り返し配列から構成されていることが明らかにされた (表 1.1, 図 1.2)。PL-B は、7 つのキチン結合ドメインの繰り返し配列 (295 アミノ酸残基) からなる分子量 34,493 の糖タンパク質である。PL-A については、収量が少ないためにその詳細な物理・化学的性質は明らかにされていないが、分子量はおよそ 19,000 であり、また N 末端 15 残基のアミノ酸配列が PL-B と全く同じであることから、PL-B の N 末端フラグメントであると考えられている。PL-C は、3 つのキチン結合ドメイン (126 アミノ酸残基) から構成される分子量 13,747 のタンパク質で、溶液中では恐らく二量体として存在すると推定された。PL-D1 は 84 アミノ酸残基からなる分子量 9,317 のタンパク質で、PL-D2 は PL-C の C 末端二残基 (Leu83_Thr84) を欠如する以外は、PL-D1 と同一配列であり、両者ともに 2 つのキチン結合ドメインからなることが示された。これまでにキチン結合ドメインを有するタンパク質は、

前述の WGA の他に、2 ドメインのイラクサ由来レクチン (UDA; *Urtica dioica* agglutinin) (Beintema & Peumans, 1992)、1 ドメインのゴムノキ樹液由来抗菌タンパク質の Hevein (Broekaert *et al.*, 1990)、アマランサス種子由来抗菌ペプチド Ac-AMPs (Broekaert *et al.*, 1992) および N-末端にキチン結合ドメインをもつクラス I キチナーゼが知られている (Broglie *et al.*, 1986; Zhu & Lamb, 1991; Yamagami & Funatsu, 1994)。この種のタンパク質において、1 ドメインの祖先が 2 ドメイン中間体を経て 4 ドメインと 2 回の遺伝子重複によって進化してきたという分子進化論が提唱されているが (Wright *et al.*, 1991)、PL-B と PL-C は、キチン結合タンパク質ファミリーのドメインの数において新規のメンバーであることが明らかとなり、先の進化論とは異なるメカニズムで PL は進化してきたと考えられる (Yamaguchi, 1997)。

PL-B, PL-C, PL-D1 および PL-D2 について生理活性を調べた結果、その強さは各 PL 分子で大きく異なることが示された (表 1.1) (Yamaguchi, 1997)。PL-B は、PL 分子の中で、最も赤血球凝集活性およびマイトジェン活性が高く、PL-C は凝集活性をもたないマイトジェンであることが示された。PL-D1 および PL-D2 は共に弱いながらも同程度の凝集活性を示すが、C 末端に 2 残基伸張した PL-D1 はマイトジェン活性を示さない。

表 1.1 PL ファミリーの性質

	分子量 (残基数)	繰り返し ドメイン数	赤血球凝集 活性	マイトジェン 活性	その他の特徴
PL-B	34,493 (295)	7	++	++	糖タンパク質
PL-C	13,747 (126)	3	-	+	二量体
PL-D1	9,317 (84)	2	+	-	PL-D1 が PL-D2 に比べて C 末端に二残基 (L83-T84) 伸張しているのを除き、両者の一次構造は全く同じ
PL-D2	9,103 (82)	2	+	+	

活性の相対的な強さを++, +の順で表し、活性を示さない場合は-で表した。

先に述べたように、これらイソレクチンの成分比は季節により変動するだけでなく採取場所にも依存するため、Yamaguchi らによって単離された PL 分子と Waxdal が単離した Pa 分子がどのように対応するのかは残念ながら明らかとなっていない。また、Yamaguchi らがマイトジェン活性測定に用いたリンパ球はヒト末梢血リンパ球であり、T 細胞と B 細胞に対するマイトジェン活性の測定は行っておらず、PL 分子が実際に T 細胞と B 細胞の両方を刺激することが出来るのか不明である。

レクチンの構造生物学的研究は数多くなされているが、そのほとんどが糖結合能に着目したものである。キチン結合タンパク質に関しても多くの構造がこれまでに決定されているが、いずれも糖鎖特異性の解明を目的としたものばかりである。本研究では、以下の点に注目し、Yamaguchi らにより単離されたドメインの数を異にすることによって多様な生理活性を発揮している一連の PL 分子を研究対象とした。

- i) 一般的に、レクチンの結合部位の多価性がその生理活性の強さを決定付けていると考えられている。5 種類の PLs 分子のうち PL-B は凝集活性およびマイトジェン活性共に最も高く、それは PL-B の 7 個のドメイン構造から賦与されると考えられる。3 個のドメインから構成される PL-C は、溶液実験から二量体で存在することが推測され、これら PLs 分子の中で PL-B について構成ドメインの数は多い。しかしながら、二価の PL-Ds と比較して、マイトジェン活性は強いが赤血球凝集能をもたない。
- ii) PL-D1 と PL-D2 は、PL-D2 より PL-D1 が C 末端 2 残基伸張している点を除き両者の一次構造は全く同じである。しかし、両者は同程度の凝集活性を示すにも関わらず、PL-D2 がマイトジェン活性を示すのに対して PL-D1 はマイトジェン活性を示さない。

以上のことから、X 線結晶構造解析の手法を用いて個々の PL 分子の立体構造を決

定し、それらの構造を比較することにより、赤血球凝集能およびマイトジェン活性能を制御する構造基盤を明らかにすることを目的として、これら一連の PL 分子の構造生物学的研究を行った。

本報告書において、第二章では、1.80 Å 分解能で決定した PL-C の結晶構造について、第三章では、1.65 Å および 1.50 Å 分解能でそれぞれ決定した PL-D1 および PL-D2 の結晶構造と更に 1.80 Å 分解能で決定した PL-D2 糖鎖複合体の結晶構造に基づき、一連の PL 分子の機能について考察する。また、第四章では、これらを総括する。

第二章 PL-C の X 線結晶構造解析

【緒言】

アメリカヤマゴボウ (*Phytolacca americana*) の根茎から単離された 5 種類のレクチンの中で、PL-C は 3 つのキチン結合ドメインから構成される分子量 13,747 のマイトジェンである。PL-C は PL-D2 に比べ比較的高いマイトジェン活性を示すにもかかわらず赤血球凝集能は示さない。また、PL-C は他の PL 分子と異なり、二量体を形成することが溶液実験から推測されている。これまでに報告されているこの種のタンパク質の中で WGA は、例外的に機能性分子として二量体を形成することが知られているが、PL-C とは異なり、この種のレクチンの中で最も高い赤血球凝集能を示す。近年、ある種のレクチンにおいて、基本的には同じドメインあるいはサブユニットが異なる様式で四次構造を形成することで異なる機能を発揮していることが明らかとなっている (Chandra *et al.*, 1999; Hamelryck *et al.*, 2000; Buts *et al.*, 2001)。そのため、レクチンと糖鎖との相互作用のみならず、レクチンの四次構造を形成するタンパク質間相互作用も注目されてきている。このようなことから、PL-C は WGA とは異なる様式で二量体構造を形成して赤血球凝集能の欠損を起こしている、つまり四次構造と機能の関わりがあるのではないかと考えられた。そこで、PL-C の三次元構造を決定し、赤血球凝集能を有する他の PL 分子や WGA と比較することで、赤血球凝集能を制御する構造基盤を明らかにすることにした。

本章においては、X 線を用いて PL-C の三次元構造を決定するために、本タンパク質を結晶化し、得られた結晶からの X 線回折強度を測定した。得られた回折強度の統計的な解析により、PL-C は双晶になる傾向が強いことが明らかとなった。結晶化条件の改善により得られた単結晶を用いて、重原子同型置換法により初期位相を

決定し、1.8 Å 分解能で構造精密化して結晶構造を決定した。PL-C は二量体を形成しており、その様式は WGA とは全く異なるものであった。以下に、結晶化、回折実験、双晶の判定や構造解析についての詳細および PL-C の二量体構造に基づく機能についての考察を述べる。

【実験方法および結果】

1. 結晶の調製

X 線結晶構造解析に先立ち、大量のタンパク質を高い純度で精製し、そのタンパク質を用いて良質の結晶を調製することが必要である。ここでいう、良質の結晶とは、ある程度の大きさを持ち、高分解能まで十分な回折強度を与える周期性の高い結晶のことを指し、更に言えば、解析の簡略化という観点から、より対称性の高い結晶のことを意味する。本研究では PL-C 試料として九州大学農学研究院遺伝子資源工学研究室においてアメリカヤマゴボウの根茎から単一タンパク質として単離・精製されたものを用いた。試料は、過飽和硫安溶液中に保存されていたので、0.1 M Tris-HCl (pH 7.5) に対して透析を行った。その後、限外ろ過により、タンパク質濃度 9.64 mg/ml まで濃縮し、これを結晶化用試料とした。

ハンギングドロップ蒸気拡散法により結晶化を行った。タンパク質溶液 1 μ l と各種沈殿剤溶液 1 μ l をシリコン処理したカバーガラス上で混合し、それを沈殿剤溶液 500 μ l を入れたリザーバーの上に逆さにかぶせ密封した。これを 25°C の恒温装置中に保存して結晶化を行った。その結果、2つの異なる晶系 (tetragonal と rhombohedral) の PL-C 結晶が得られたのでそれらについて以下に述べる。

1. 1. tetragonal 結晶

1.1.1. 結晶化

tetragonal 結晶は、30% (w/v) PEG4000 と 0.2 M MgCl_2 を含む 0.1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.5) を沈殿剤溶液として用いたときに得られた。しかし、ここで得られた結晶は非常に小さかったため、この結晶を種結晶としたマクロシーディング法を繰り返すことにより、回折実験に適した大きさの結晶を得ることができた。この結晶は、5 日程度で図 2.1 のような bipyramid 形の結晶に成長した。しかし、後述するように、この結晶は一見すると単結晶と思えるが、回折強度の統計的な解析により、高い双晶率を持った双晶であることが判明した (Hayashida *et al.*, 2003)。そこで、X 線結晶構造解析に適した単結晶を得るため、結晶化条件の改善を行った。PEG を中心とした結晶化条件の検討の結果、幾つかの異なる条件で bipyramid 形とは異なる形をした結晶が得られたが、それらは tetragonal 晶系に属し、いずれも双晶としての結晶学的性質を示した。

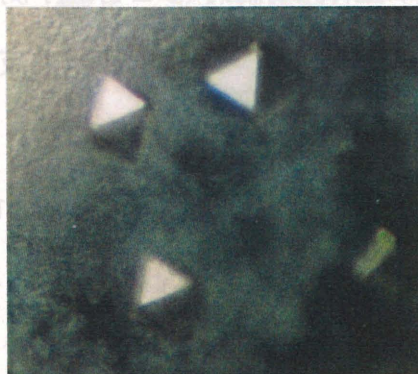


図2.1 tetragonal結晶の顕微鏡写真
結晶はおよそ $0.2 \times 0.2 \times 0.2$ mm
の大きさまで成長した。

1.1.2. 結晶学的パラメータの決定

X 線回折実験は京都大学化学研究所で行った。X 線源としては、管電圧 40 kV、管電流 100 mA で稼動させた回転対陰極 X 線発生装置 RU-300 から得られた X 線をグラファイトモノクロメーターで単色化させ 0.3mmφ のコリメーターで導いた Cu K α 線($\lambda=1.542$ Å) を用いた。また、回折強度の検出は、IP を二次元検出器として備えた R-AXIS IIc システムにより行った。

ガラスキャピラリーに結晶化母液とともに結晶を封入し、室温にて X 線を照射した。なお、過剰の母液が結晶に付着していると測定中に結晶が動くか、あるいは回折 X 線のバックグラウンドが高くなり回折強度データの精度に悪影響を及ぼすため、過剰の母液が結晶周辺に残らないようにあらかじめガラスキャピラリーの内壁をシリコンコートしておいた。以下 PL-D1 を除く全ての回折強度測定にはこのシリコンコート済みキャピラリーを用いた。

本 PL-C 結晶は 2.8 Å 分解能までの回折点を与え、プログラム DENZO/SCALEPACK (Otwinowski & Minor, 1997) を用いた auto-indexing の結果、正方晶系に属し空間群は $P4_1$ あるいは $P4_3$ 、格子定数は $a=b=47.9$, $c=72.2$ Å と求められた。溶液実験から、PL-C は二量体で存在することが予測されたため、本結晶の非対称単位中に、PL-C サブユニットが 2 つ含まれていると仮定すると、単位分子量あたりの体積 (V_M) は $1.50 \text{ Å}^3 \text{ Da}^{-1}$ 、溶媒含量は 18% となる。通常、タンパク質結晶の場合 V_M 値は $1.7 \sim 3.5 \text{ Å}^3 \text{ Da}^{-1}$ の範囲の値をとることが知られており (Matthews, 1968)、上記の値は、タンパク質結晶としては極端に低い値である。一方、本結晶の非対称単位中に PL-C サブユニットが 1 つ含まれていると仮定すると、 V_M 値は $3.01 \text{ Å}^3 \text{ Da}^{-1}$ 、溶媒含量は 60% となり、タンパク質結晶として妥当な値を与えるが、二量体形成に矛盾する。そこで、非対称単位中に等価な構造単位が存在すると仮定し、それらの相対的位置を求めるために後述する方法で収集した回折強度データを用いて自己回折関数を計算した。図 2.2a が示すように、 $[1\ 1\ 0]$ 方向に非結晶学的二回軸の存在を示す $9.2\ \sigma$ のピークが観測された。よって非対称単位中に PL-C が二量体で一分子存

在すると仮定した時の V_M 値は低い値ではあるけれども、単位胞内の分子数 (Z) は 4 であると決定した。tetragonal 結晶の結晶学的パラメータを表 2.1 にまとめる。

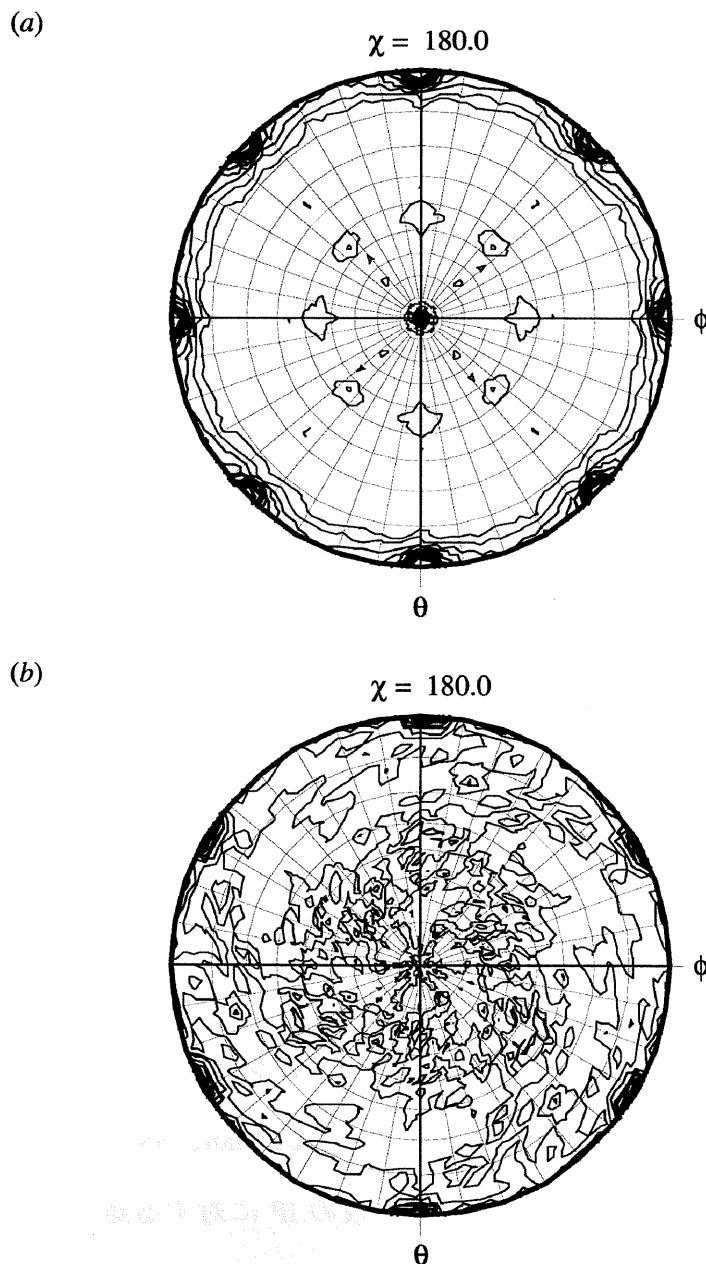


図 2.2 自己回転関数のステレオ投影図

(a)および(b)は、それぞれ tetragonal 結晶および rhombohedral 結晶の回折強度データを用いて自己回転関数を計算し、セクション $\chi = 180.0$ の面の値をプロットしたものを示す。両計算とも 10–4.0 Å 分解能の反射を用いて行われた。

表2.1 tetragonal結晶の結晶化条件および結晶学的データ

<i>Crystallization conditions</i>	
Method	hanging drop vapor diffusion
Protein solution	9.64 mg/ml in Tris-HCl buffer (pH7.5)
Precipitant	30%(w/v) PEG4000
	0.2 M MgCl ₂
	0.1 M Tris-HCl (pH 8.5)
Temperature	25 °C
<i>Crystallographic Data</i>	
Space group	$P4_1$ or $P4_3$
Lattice parameters	$a = b = 47.9 \text{ \AA}$, $c = 72.2 \text{ \AA}$
Z	4 (非対称単位にPL-C二量体で1分子存在)
V_M	$1.50 \text{ \AA}^3 \text{Da}^{-1}$
Solvent contents	18%

1.1.3. 回折強度測定

回折強度データの収集は前述の R-AXIS IIc システムにより行い、データ処理はプログラム DENZO/SCALEPACK (Otwinowski & Minor, 1997)を用いた。

結晶から IP までの距離を 95 mm、一枚の IP に対する露光時間を 20 分、IP 一枚あたり ϕ 軸回りの結晶の回転角度を 2°に設定して、2.8 Å 分解能までのデータの測定を行った。計 47 枚の IP を処理した結果、全体で 32,067 個の反射を観測することができた。異なる IP 間で等価な反射強度間のスケール因子を計算してスケールを合わせた後に等価な反射をマージした結果、3,707 個の独立反射を得ることができた。デ

一タの完全性は 90.6%、等価な反射の一致度 R_{merge} は 5.4%であった。データ収集と処理の統計値を表 2.2 に示す。

表2.2 双晶結晶のデータ収集と処理結果

Data set	tetragonal	rhombohedral
<i>Data collection</i>		
X-ray source	RU-300	RU-300
Wavelength (Å)	1.542	1.542
Max. resolution (Å)	2.80 (2.90–2.80) ^a	2.00 (2.07–2.00)
Number of reflections		
Observation	32,067	146,035
Unique	3,707	18,134
Redundancy	8.7	8.1
Completeness (%)	90.6 (69.3)	94.6 (85.0)
R_{merge}^b (%)	5.4 (27.6)	12.8 (29.4)
$I/\sigma(I)$	11.3 (1.7)	7.9 (2.0)

^a Values in parentheses refer to the highest resolution shell.

^b $R_{\text{merge}} = \sum_i |I_i - \langle I_i \rangle| / \sum_i I_i$, where $\langle I_i \rangle$ is the average of I_i over all symmetry equivalents.

1.2. rhombohedral 結晶

1.2.1. 結晶化

rhombohedral 結晶の結晶化は、tetragonal 結晶の結晶化で述べた手順に従って行った。rhombohedral 結晶は、2.0 M 硫酸アンモニウムを含む 0.1 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.6) を沈殿剤溶液として用いたときに得られた (図 2.3)。この結晶は 1 週間程度で X 線結晶構造解析に適した大きさに成長したが、tetragonal 結晶で観察され

たのと同様な双晶としての性質を示した (後述)。



図2.3 rhombohedral結晶の顕微鏡写真
結晶はおよそ $0.2 \times 0.4 \times 1.0$ mmの大きさ
まで成長した。

1.2.2. 結晶学的パラメータの決定

rhombohedraral 結晶の X 線回折実験は、tetragonal 結晶と同様にして同じ X 線発生装置および検出器を用いて行った。

本結晶は 2.0 \AA 分解能までの回折点を与え、プログラム DENZO/SCALEPACK (Otwinowski & Minor, 1997) を用いた auto-indexing の結果、三方晶系に属し空間群は $R3$ 、格子定数は $a=b=104.1 \text{ \AA}$, $c=69.7 \text{ \AA}$ (hexagonal setting) と求められた。本結晶の非対称単位中に PL-C サブユニットが 1 つ含まれていると仮定すると、 V_M 値は $5.29 \text{ \AA}^3 \text{ Da}^{-1}$ 、溶媒含量は 77%となる。一方、2 つ含まれていると仮定すると、 V_M 値は $2.64 \text{ \AA}^3 \text{ Da}^{-1}$ 、溶媒含量は 53%となり、タンパク質結晶として妥当な値を与える。rhombohedral 結晶に関しても、tetragonal 結晶の場合と同様にして、自己回転関数の計算を行った結果 (図 2.2b)、弱いながらも非結晶学的二回軸を示す 3.2σ のピークが ($\theta=90.00$, $\phi=-64.07$, $\chi=180.00^\circ$) の位置に観測された。よって、二量体で 1 分子とした場合の Z は 9 であると決定した。rhombohedral 結晶の結晶学的パラメータを表 2.3

にまとめる。

表2.3 rhombohedral結晶の結晶化条件および結晶学的データ

<i>Crystallization condition</i>	
Method	hanging drop vapor diffusion
Protein solution	9.64 mg/ml PL-C in MTris-HCl buffer (pH 7.5)
Precipitant	2.0 M ammonium sulfate 0.1 M Na-acetate (pH 4.6)
Temperature	25 °C
<i>Crystallographic Data</i>	
Space group	$R3$
Lattice parameters	$a = b = 104.1 \text{ \AA}$, $c = 69.70 \text{ \AA}$ $\alpha = \beta = 90^\circ$, $\gamma = 120^\circ$
Z	9 (非対称単位にPL-C二量体で1分子存在)
V_M	$2.65 \text{ \AA}^3 \text{Da}^{-1}$
Solvent contents	53%

1.2.3. 回折強度測定

回折強度データの収集は前述の R-AXIS IIc システムにより行い、データ処理にはプログラム DENZO/SCALEPACK (Otwinowski & Minor, 1997) を用いた。

結晶から IP までの距離を 95 mm、一枚の IP に対する露光時間を 15 分、IP 一枚あたり ϕ 軸回りの結晶の回転角度を 1.5° に設定して、 2.0 \AA 分解能までのデータの測定を行った。計 122 枚の IP を処理した結果、全体で 146,035 個の反射を得ることができた。個々の IP におけるスケール因子を計算し等価な反射をマージした結果、18,134 個の独立反射を得ることができた。データの完全性は 94.6%、 R_{merge} は 12.8%であつ

た。データ収集と処理の統計値を表 2.2 に示す。

2. 双晶

2.1. 双晶について

結晶中のすべての原子・分子が三次元周期的に配列しているという性質を利用して X 線結晶構造解析が適用され、結晶構造が原子レベルで明らかにされてきた。その一方で双晶という現象もしばしば観測され、解析において障害となっている。ここで言う双晶とは、一つの結晶が複数の異なる方位を持つ結晶単位から構成されている状態を指す。この種の双晶は、結晶解析の初期の段階で、Bravais, Mallard や Friedel らによって観測され報告されている (Chan, 1954)。これまでに多くの観測例が報告されているが、双晶は異常な結晶成長の結果であるという訳ではなく、一つの結晶の形態らしい。例えば、双結晶中において、双晶要素は完全に無秩序に結合していることは無く、必ずそれらの結晶面や結晶軸に何らかの関係が存在する。そのため、どのような双晶になるかは、サンプルの性質や結晶化条件によって決まってくる。双晶がどのように生成するかについては議論が分かれるところであるが、現在のところ 3 つに分類されている。相転移によるもの、物理的刺激によるもの、そして結晶成長過程に生じるものである。ここで、一番問題になるのは、最後に挙げた結晶成長過程において双晶となってしまうものである。これは本来もっている性質上双晶となるもので必ず双晶になってしまい、多くの場合、単結晶にすることが不可能である。

双晶の詳しい様式や分類については International table にレビューされている (Koch, 1992) ため、ここではタンパク質の結晶について焦点を絞って話を進める。タンパク質結晶の場合、対称心が存在しないため、双晶様式が限定されてしまう。すなわち、回折点がすべて完全に重なってしまう双晶と、回折点が完全には重なら

ない双晶の二つに分けられる。回折点が完全に重なってしまう双晶は *merohedral* 双晶と呼ばれる。この場合、観測される回折強度は、構成する双晶要素それぞれからの回折強度の級和となる。*hemihedral* 双晶はこの *merohedral* 双晶の最も単純かつ一般的な場合で、結晶が二つの双晶要素のみから構成され、それらが二回対称で関係付けられている。この双晶対称が加わるため、双晶要素の割合が同じ場合には、回折パターンのラウエ対称が上昇する。

回折点が完全には重ならない結晶の場合、当然回折条件が異なるので回折像から容易に双晶であると判断できる。また、多くの場合、偏光を利用した実体顕微鏡により容易に観察できる。しかし、*merohedral* 双晶の場合は回折点が完全に一致し、回折格子の形状が同じために偏光特性も同様になるので、単結晶と同じ振る舞いを見せる。そのため、複数の観測事実の矛盾点から双晶であると推定するしかない。

これまでに報告された双晶に関して、以下の事が共通に観測されている。

- i) 自己回転関数を計算すると結晶のパッキングからは想定不可能な 2 回回転対称を示すピークが存在する。
- ii) タンパク質結晶の場合、一般的に溶媒とタンパク質分子の比率 (V_M 値) が制限されるが、双晶の場合それを越えることが多い。

hemihedral 双晶の場合、結晶は実際二つの双晶要素のみから構成され、それらが二回対称で関係付けられており、i) における自己回転関数により得られた 2 回回転対称を示すピークは、この二つの双晶要素を関係付ける双晶操作を表すと考えられる。そして、その双晶対称を分子対称として考慮にいれると、過剰な分子が非対称単位中に存在することを想定しなければならなくなるため ii) の様な現象が起こるのだと考えられる。

上記に挙げた現象は双晶に対する兆候として認識されており、PL-C の *tetragonal* 結晶でも同様に観測されたため、回折強度の統計的な解析による双晶の判定を行った。

2.2. 双晶の評価方法

結晶解析を行うためには、単結晶成分からの回折強度を測定しなければならない。回折点が完全には重ならない結晶では、それぞれの双晶要素の方位を決定し、重なりのない反射の回折強度から他の反射の回折強度を分離するという方法が効果的である。これには、Kabsch のプログラムに代表されるデータリダクション法が有効である(Kabsch, 1998)。このタイプの双晶の場合、単一成分からの反射を利用できるため、重ならない反射の数にもよるが、多くの場合、強度分離可能である。それに対し、回折点がすべて重なり合う *hemihedral* 双晶の場合、強度分離は非常に困難となる。現在までのところこの種の双晶の評価法としては、

- i) 回折強度に負はないことを利用し、強度を統計的に評価する方法 (Britton プロット)(Britton, 1972; Fisher & Sweet, 1980)
- ii) Wilson の強度分布関数を利用し、累積関数の形状から評価する方法 (Wilson, 1949; Howells *et al.*, 1950)
- iii) 分子モデルを利用して、 F_o を計算できる時に R 値や相関係数を最小化するように強度分離する方法 (Murray-Pust, 1973; Matthews *et al.*, 1993; Gomis-rüth *et al.*, 1995)

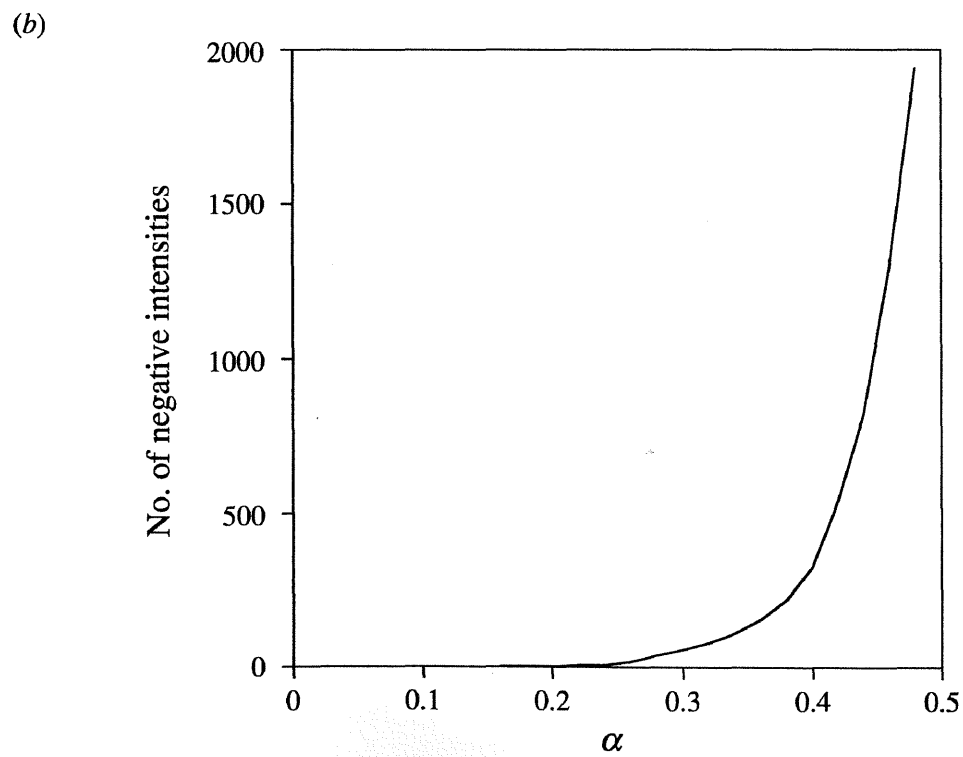
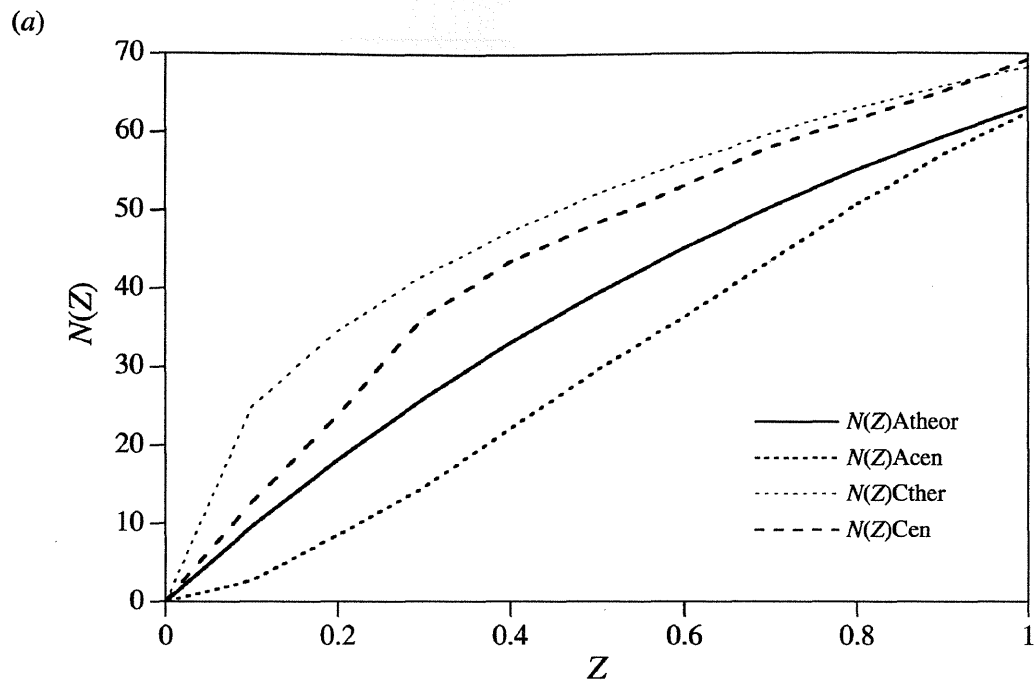
の 3 つの方法が提案されている。しかし、ii) の方法は原理的に双晶の判定には向いているが、正確な強度分離には向いていない。また iii) の方法は利用できるモデルがない場合には適用できない。そのため、今のところ *hemihedral* 双晶を利用し新規構造を決定するには、i) および ii) の方法を用いた双晶の判定と双晶率の見積もりを行い、強度分離するのが唯一の方法であると言える。実際、これらの方法もしくはそれらをアレンジした方法を用いた解析例がいくつか報告されている。

2.3. 双晶の判定

2.2 節で説明した種々の方法を適用するにあたり、第一に双晶操作を求めなければならない。タンパク質結晶で一般的な hemihedral 双晶において、結晶は実際二つの双晶要素のみから構成され、それらは互いの回折パターンが正確に重なるように配向している。それ故、双晶操作で関係付けられる 2 つの反射はそれぞれ独立して観測される回折強度に寄与し、パターン図にピークを与える。tetragonal 結晶の自己回転関数で示されたピーク (図 2.2a) は、この結晶における双晶操作に相当すると考えられる。これらの観測事実から、tetragonal 結晶は c 軸に対して互いに逆方向を向いた同一格子から形成されている hemihedral 双晶であると判断した。すなわち指数 (hkl) と $(kh-l)$ はこの双晶操作で関係付けられる。tetragonal 結晶の $N(Z)$ プロットを計算したところ、非セントリック反射の曲線はシグモイダル形状を示し、はっきりと双晶としての性質を示していることがわかった (図 2.4a)。Britton プロットを計算した結果、双晶率は 0.4 と見積もられた (図 2.4b)。Britton プロットから見積もられる双晶率は近似値であり、この値と比較するため Yeates の方法に従い計算したところ、双晶率は 0.39 と Britton プロットの値とさほど違いはなく、この結晶の双晶率はおよそ 0.4 であるとした (図 2.4c)。rhombohedral 結晶に関しても同様の計算を行った結果、双晶率がおよそ 0.2 の双晶であることが判明した (図 2.5)。

ここで問題になるのは (2) 式の性質上、双晶率が 0.5 に近づけば近づくほど式の信頼性が無くなり、完全に割合が同じ、つまり双晶率が 0.5 の場合には解けなくなる。直感的には、(2) 式の分子における強度の差分に含まれる誤差が、分母の値が小さくなることにより増幅されてしまうためと理解できる。Eleanor によると強度分離可能な双晶率はせいぜい 0.35 以下であり、実際これまでに双結晶から双晶率を見積もって強度分離を行い構造決定に成功している例の多くは 0.2 以下である (Collaborative Computational Project, Number 4, 1994)。rhombohedral 結晶に関してはその双晶率が 0.2 であることから、見積もられた双晶率を用いて (2) 式に従い強度分離を行った。強度分離したデータを用いて $N(Z)$ プロットにおける非セントリック反

射の分布曲線がその理論分布曲線に従うのならば、正しく強度分離出来たと考えられる。しかし、実際に強度分離したデータの分布曲線はその理論分布曲線に従わず、見積もられた双晶率および強度分離されたデータの信頼性は低いと考えられた。残念ながら、tetragonal および rhombohedral 結晶共に強度分離は適さないと判断し、X 線結晶構造解析に適した単結晶を得るべく結晶化条件の改善を試みた。



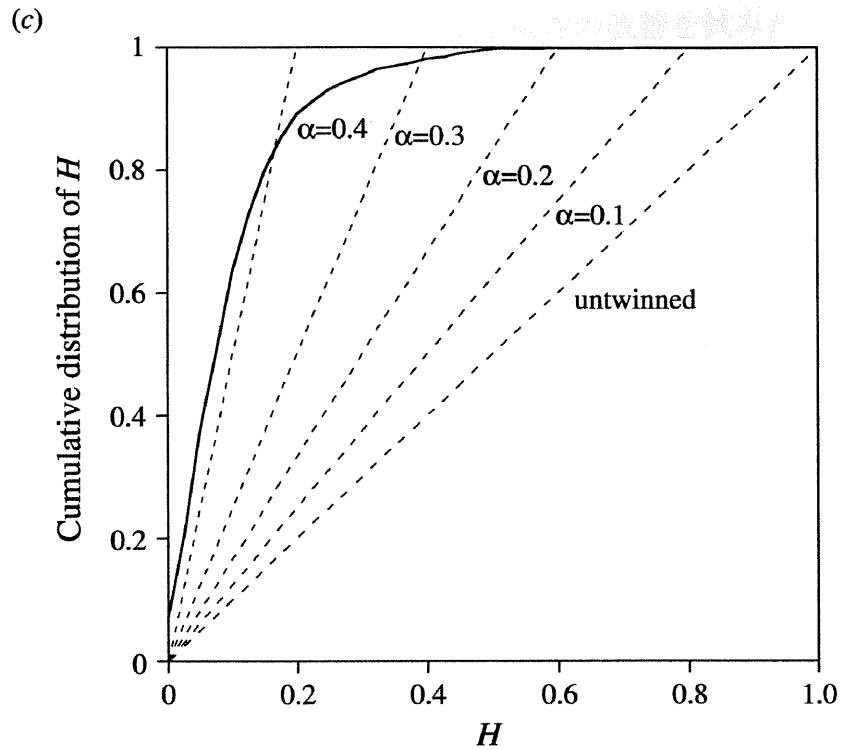


図 2.4 tetragonal 結晶の回折強度に対する統計的解析

(a) $N(Z)$ プロット

Atheor, 非セントリック反射に対する理論分布曲線

Acen, 実際に測定された非セントリック反射に対する分布曲線

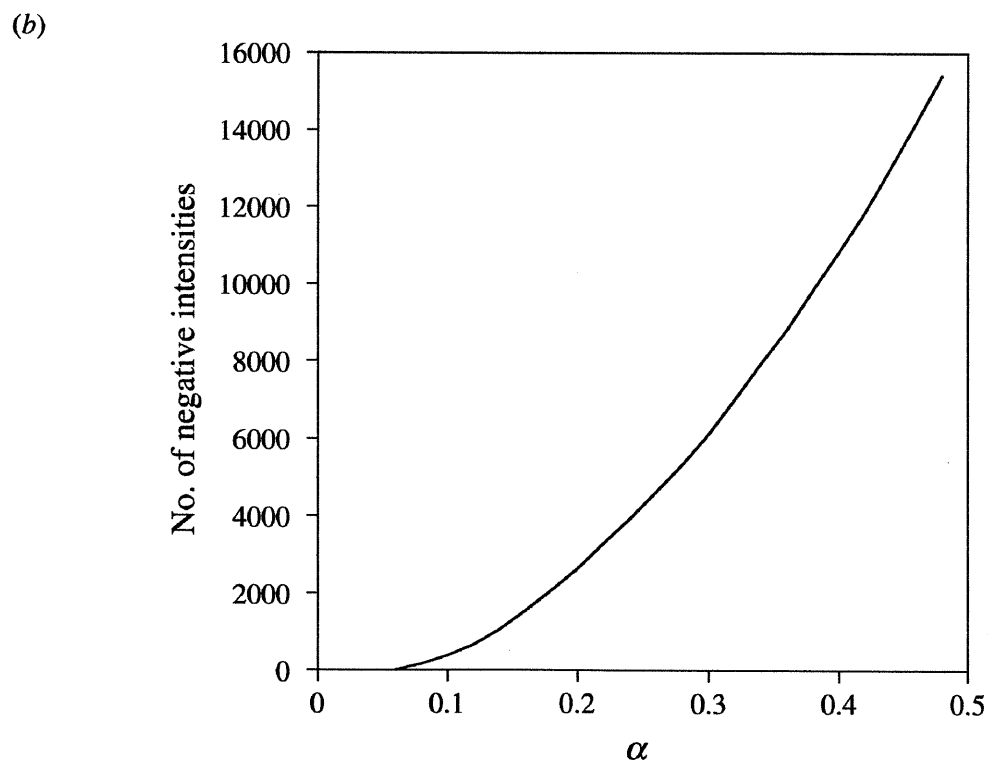
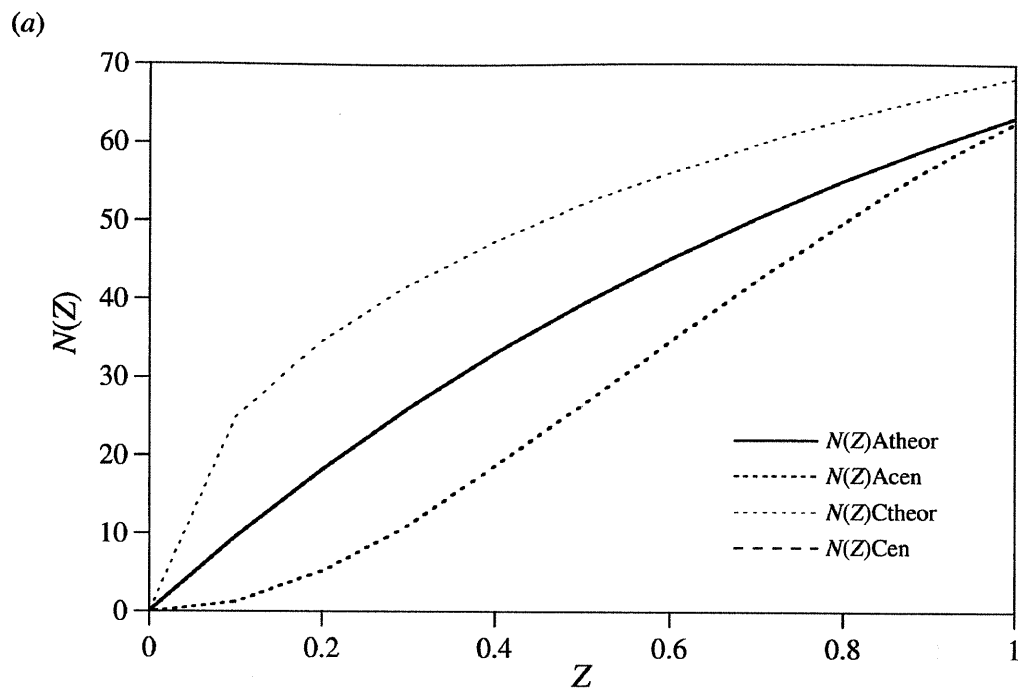
Ctheor, セントリック反射に対する理論分布曲線

Cen, 実際に測定されたセントリック反射に対する分布曲線

(b) Britton プロット

プロットの立ち上がりの双晶率が、この結晶の大体の双晶率を示す

(c) パラメータ H の累積分布



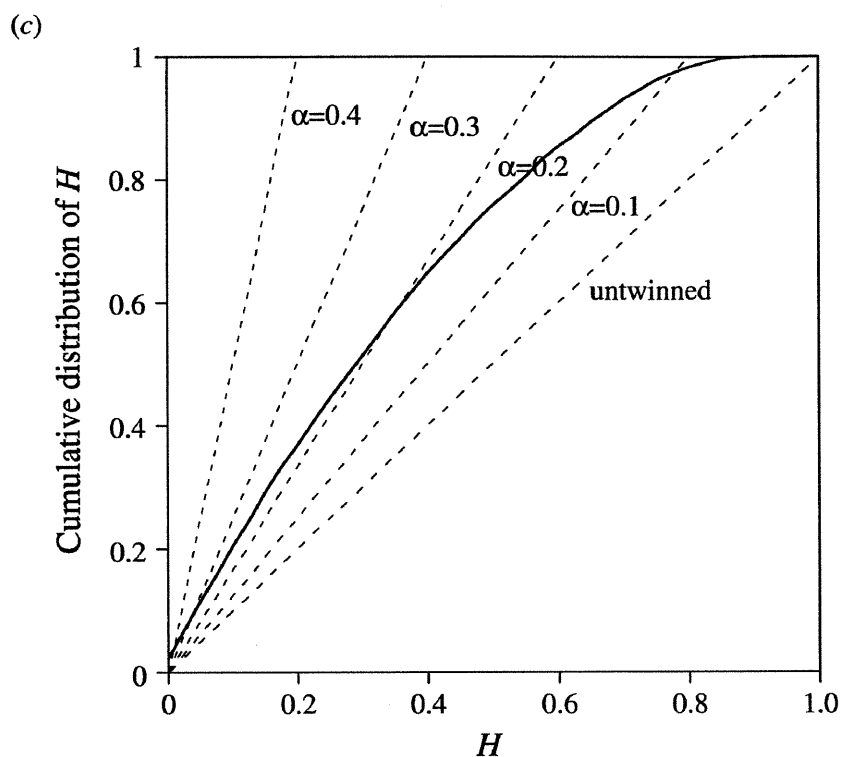


図 2.5 rhombohedral 結晶の回折強度に対する統計的解析

(a) $N(Z)$ プロット

rhombohedral 結晶は空間群 $R3$ に属するため、セントリック反射は観測されない。

(b) Britton プロット

(c) パラメータ H の累積分布

3. 単結晶

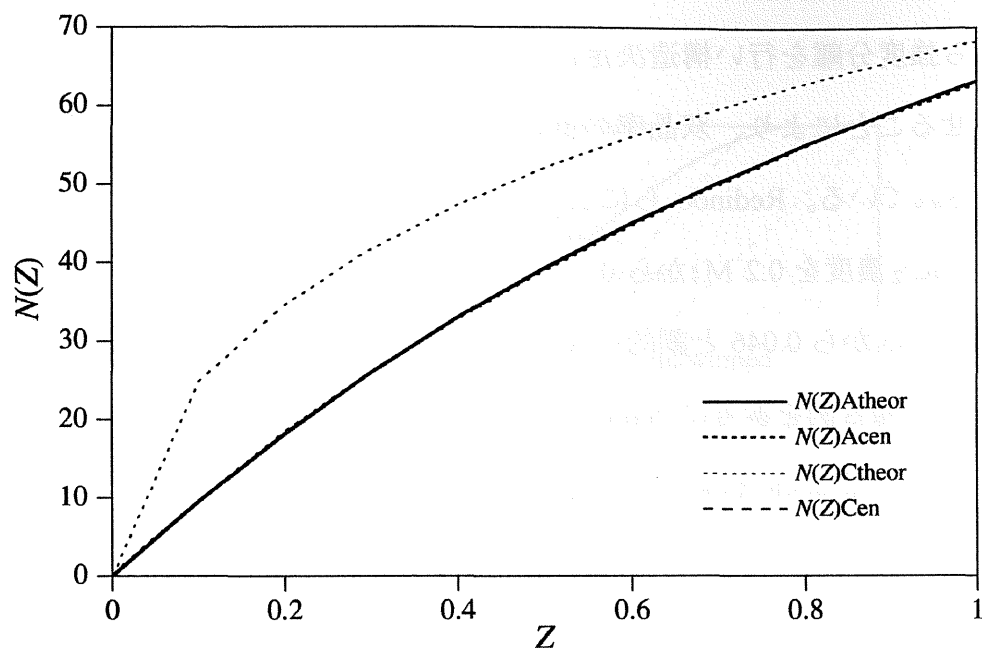
3.1. 結晶化条件の改善

双晶から強度分離を行い構造決定に至っているものの中で、その結晶化条件を少し変化させることにより、双晶率の低い結晶を得ることに成功しているものはいくつか報告されている。Redinbo らによる Plastocyanin の解析例を紹介すると、結晶化溶液中の CaCl_2 濃度を 0.2 M から 0.1 M にし、さらに 0.1 M CoCl_2 を加えることにより双晶率を 0.45 から 0.046 と劇的に減少させることに成功している (Redinbo *et al.*, 1993)。これらの報告例を参考に tetragonal および rhombohedral 結晶の結晶化条件、例えば温度、pH、添加剤(有機溶媒等)の有無に着目し、少しずつ条件を変えながら結晶化を行った。しかし、そのほとんどは結晶が全く得られないか、あるいは同じ双晶であるという結果であったが、rhombohedral 結晶の結晶化溶液に 0.5% dioxane を加えることによって、X 線結晶構造解析に適した単結晶を得ることに成功した (図 2.6)。この結晶における $N(Z)$ プロットが示すように非セントリック反射の曲線は理論曲線に従い、Britton プロットおよび Yeates の方法を用いた結果からも双晶ではないことは明らかである (図 2.7)。

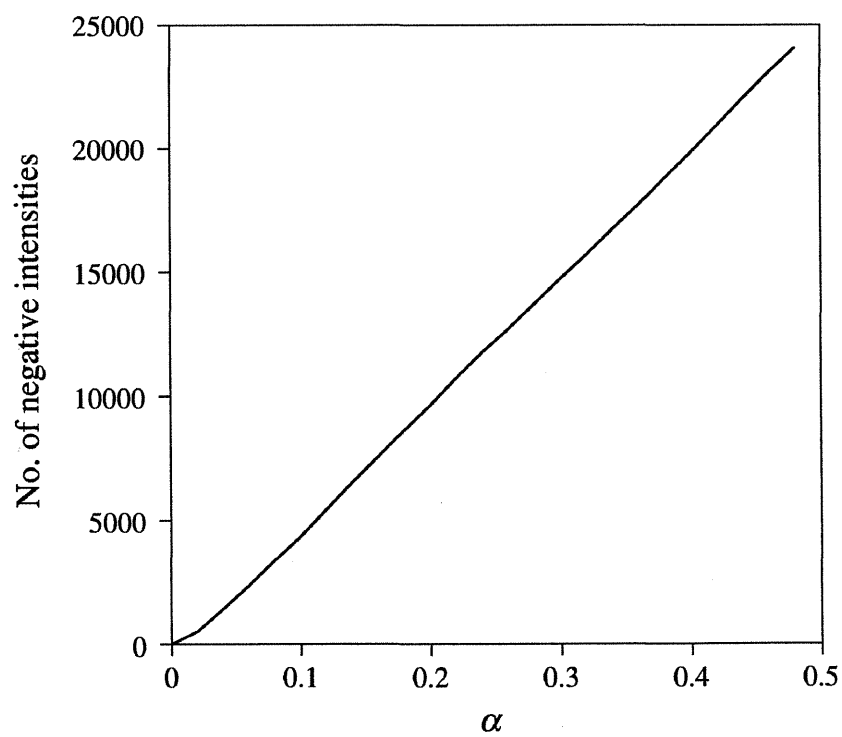


図2.6 rhombohedral単結晶の顕微鏡写真
結晶はおよそ $0.2 \times 0.3 \times 1.0$ mmの大きさ
まで成長した。

(a)



(b)



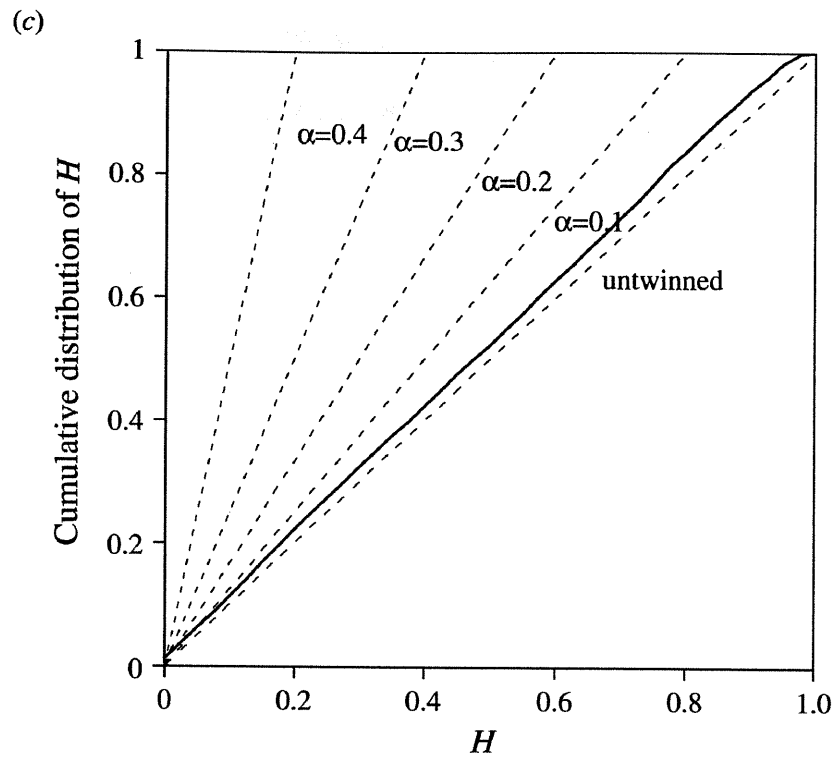


図 2.7 rhombohedral 単結晶の回折強度に対する統計的解析

(a) $N(Z)$ プロット

rhombohedral 単結晶も空間群 $R3$ に属す故、セントリック反射は観測されない。

(b) Britton プロット

(c) パラメータ H の累積分布

3.2. 結晶学的パラメータの決定

高エネルギー加速器研究機構 物質構造科学研究所 放射光研究施設の BL18B において、波長 1.000 Å の X 線を用いて放射光実験を行った。また回折強度は 2×2 アレイ型 CCD 検出器 (ADSC 社製 Quantum4) を用いて測定した。

本結晶は 1.8 Å 分解能まで回折点を与え、CCP4 プログラムスーツ (Collaborative Computational Project, Number 4, 1994) の DPS/MOSFLM (Leslie, 1992; Evans, 1993) を用いた auto-indexing の結果、三方晶系に属し、空間群は $R3$ 、格子定数は $a=b=104.1$ Å、 $c=69.7$ Å であり rhombohedral 双晶と同型であった。本結晶の非対称単位に PL-C サブユニットが 2 つ存在していると仮定すると、 V_M 値は $2.64 \text{ Å}^3\text{Da}^{-1}$ 、溶媒含量は 53 % となりタンパク質結晶として妥当な値を与える。よって、二量体で 1 分子とした時の Z は 9 であると決定した。PL-C 単結晶の結晶学的パラメータを表 2.4 にまとめる。

表2.4 rhombohedral単結晶の結晶化条件および結晶学的データ

<i>Crystallization Conditions</i>	
Method	hanging drop vapor diffusion
Protein solution	9.64 mg/ml in Tris-HCl buffer (pH7.5)
Precipitant	1.5 M ammonium sulfate
	0.5% dioxane
	0.1 M Na-acetate (pH 4.6)
Temperature	25 °C
<i>Crystallographic Data</i>	
Space group	$R3$
Lattice parameters	$a = b = 104.1 \text{ Å}$, $c = 69.70 \text{ Å}$ $\alpha = \beta = 90^\circ$, $\gamma = 120^\circ$
Z	9 (非対称単位に PL-C 二量体で 1 分子存在)
V_M	$2.65 \text{ Å}^3\text{Da}^{-1}$
Solvent contents	53%

3.3. 回折強度測定

結晶から CCD までの距離を 150 mm、1 フレームあたりの露光時間を 30 秒、振動角 1° に設定して、1.8 Å 分解能までのデータ測定を行った。計 120 フレーム処理した結果、全体で 134,896 反射を観測することができた。個々のフレームにおけるスケール因子を計算し等価な反射をマージした結果、26,091 個の独立反射を得ることができた。データの完全性は 99.9 %、 R_{merge} は 6.70 % であった。データ収集と処理の統計値を表 2.5 に示す。

表2.5 重原子誘導体の調整条件およびデータ収集と処理結果

Data set	Native	Hg	U
<i>Soaking conditions</i>			
Reagent	-	HgCl ₂	UO ₂ (CH ₃ COO) ₂
Concentration	-	1 mM	10 mM
Period	-	5 hrs	1 week
<i>Data collection</i>			
X-ray source	PF (BL18B)	PF (BL18B)	RU-300
Wavelength (Å)	1.000	1.000	1.5418
Max. resolution (Å)	1.80 (1.89–1.80) ^a	3.00 (3.16–3.00)	2.80 (2.90–2.80)
Number of reflections			
Observation	134,896	26,694	31,031
Unique	26,091	5,680	6,438
Redundancy	5.2	4.7	4.8
Completeness (%)	99.9 (99.9)	99.7 (97.9)	92.4 (83.9)
R_{merge}^b (%)	6.70 (27.9)	6.50 (11.8)	9.90 (19.8)
R_{iso}^c (%)	-	14.0	19.0

^a Values in parentheses refer to the highest resolution shell.

^b $R_{\text{merge}} = \sum_i |I_i - \langle I_i \rangle| / \sum_i I_i$, where $\langle I_i \rangle$ is the average of I_i over all symmetry equivalents.

^c $R_{\text{iso}} = \sum ||F_{\text{PH}}| - |F_{\text{P}}|| / \sum |F_{\text{P}}|$, where $|F_{\text{PH}}|$ and $|F_{\text{P}}|$ are the derivative and native structure factor amplitudes, respectively.

3.4. 重原子誘導体結晶の調製

PL-C 結晶の位相決定には、現在最も一般的方法である重原子同型置法を適用した。重原子同型置換法は、タンパク質結晶 (ネイティブ結晶) とそれを重原子でラベルしたもの、つまりタンパク質分子に重原子種を付加させた結晶 (デリバティブ結晶) の回折強度の差を利用して位相角を決定する方法である。そのため重原子同型置換法を適用するにあたり、第一に、重原子をタンパク質結晶中に導入しなければならない。ネイティブ結晶に重原子を導入するときは、結晶内のタンパク質の相対的配置と分子構造の両方に変化を起こさないようにすることが肝要で (同型性の保存)、この条件が満たされないとネイティブ結晶とデリバティブ結晶の回折強度差は位相決定に利用できない。重原子誘導体の検索は、結晶化と同様、現在でも基本的には試行錯誤的に行っており、ときには有効な誘導体を得るのに結晶化以上の労力が必要となることもある。重原子の付加には、重原子を含んだ結晶化母液にタンパク質結晶を浸漬する最も簡便な方法を選んだ。

数十種類におよぶ重原子試薬について検討を行った。同型性は、実際にデリバティブ結晶の回折データを収集し、重原子付加により格子定数がネイティブ結晶のそれと変わらないことを確認した。また、ネイティブ結晶とデリバティブ結晶の強度変化率 (R_{iso}) が 5~7%程度のは重原子が導入されている可能性は低いと考えて採用せず、適度な R_{iso} (10~15%) を示すものを以降の解析に用いた。実際には、ネイティブ結晶の回折強度 $I_P (=|F_P|^2)$ に対してデリバティブ結晶の回折強度 $I_{PH} (=|F_{PH}|^2)$ をスケール合わせしたあと、 $(|F_{PH}| - |F_P|)^2$ を係数とする差パターンソン関数を計算し、パターンソン図のハーカー面のピークを調べることで、重原子が導入されたかどうかを検定した。その結果、Hg と U の 2 種類の良好なデリバティブ結晶が得られた。後の位相決定に用いた Hg および U 誘導体についてのみ、その調製条件を表 2.5 に、差パターンソン図のハーカー面を図 2.8 に示す。

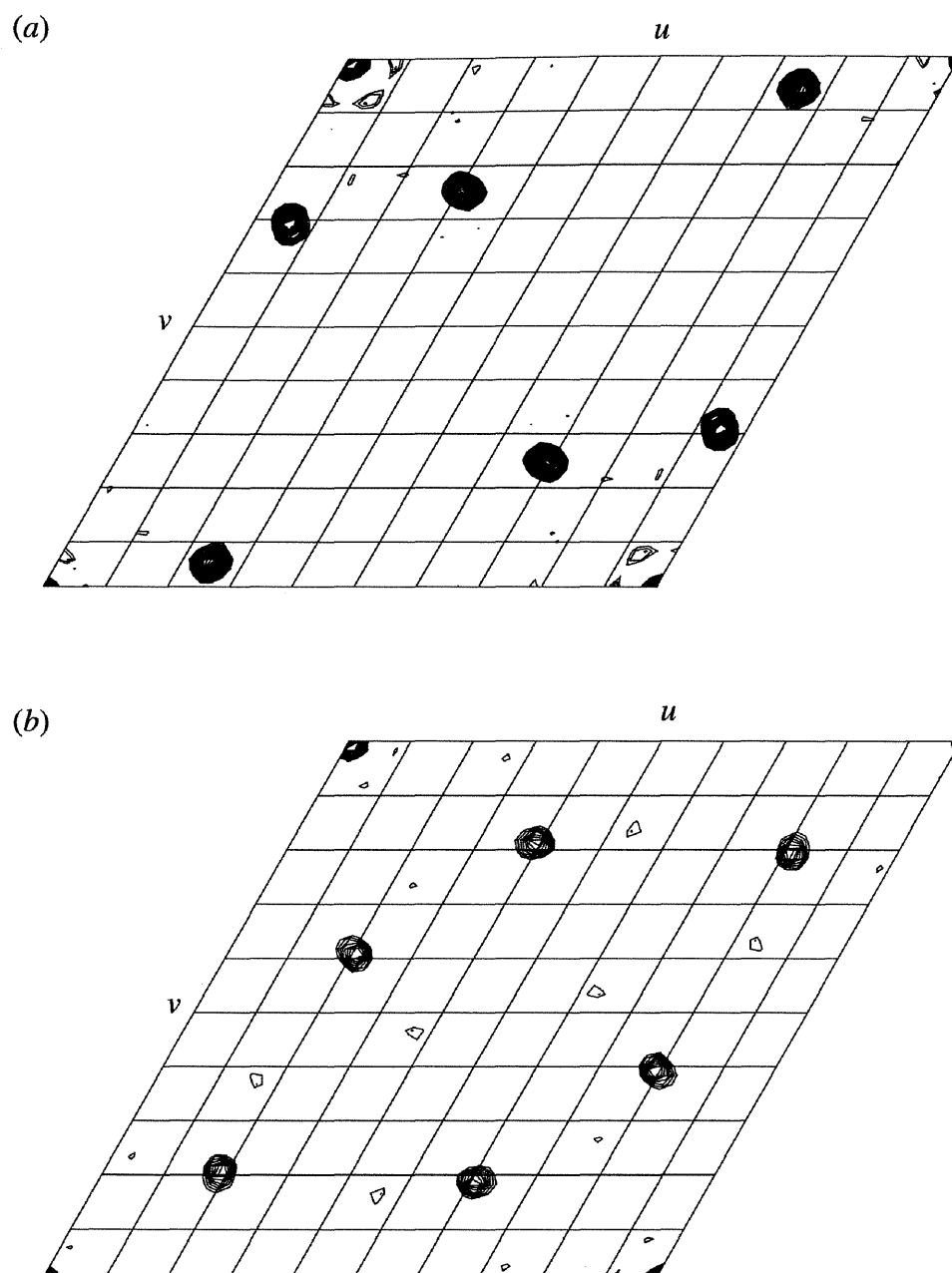


図 2.8 同型差パターン図のハーカー面 ($w = 0$)

(a) Hg 誘導体 (b) U 誘導体

両誘導体に対する差パターン関数の計算には、共に $10\text{-}5 \text{ \AA}$ 分解能の反射が用いられた。

3.5. 重原子誘導体結晶の回折強度測定

Hg 誘導体結晶の X 線回折実験を、高エネルギー加速器研究機構 物質構造科学研究所 放射光研究施設のビームライン BL18B で行わった。波長 1.000 Å の X 線を用い、2×2 アレイ型 CCD (ADSC 社製 Quantum-4) で回折強度を測定した。データ処理のためのプログラムとして CCP4 プログラムスーツ (Collaborative Computational Project, Number 4, 1994) の DPS/MOSFLM (Leslie, 1992; Evans, 1993) を用いた。U 誘導体結晶の X 線回折実験は、京都大学化学研究所にて、双晶の場合と同じ X 線発生装置と検出器を用いて行い、プログラム DENZO/SCALEPACK (Otwinowski & Minor, 1997) によりデータ処理を行った。

両誘導体結晶とも X 線照射による損傷を受けやすく、迅速な回折強度収集が必要とされた。しかし、3 Å 分解能までの反射を用いれば、少なくともタンパク質主鎖の流れを追うことができる程度の電子密度図が得られ、また電子密度修飾の手法を用いればその電子密度図をもとにして位相を拡張して分解能を向上させることもできる。そこで、Hg および U 誘導体結晶共に 3 Å 分解能以上の回折点が観測されたが、X 線損傷によるデータの質の低下を考慮し、3 Å 分解能程度の回折データを収集するにとどめた。両誘導体結晶の回折強度データの統計学的数値を表 2.5 に示す。また、Hg 誘導体に関しては、Hg の L_{III} 吸収端 (1.009 Å) 近傍の波長 1.000 Å で測定したこともあり、異常分散効果を測定することができた。Hg 誘導体結晶からの異常分散効果を利用した差パターン図を図 2.9 に示す。

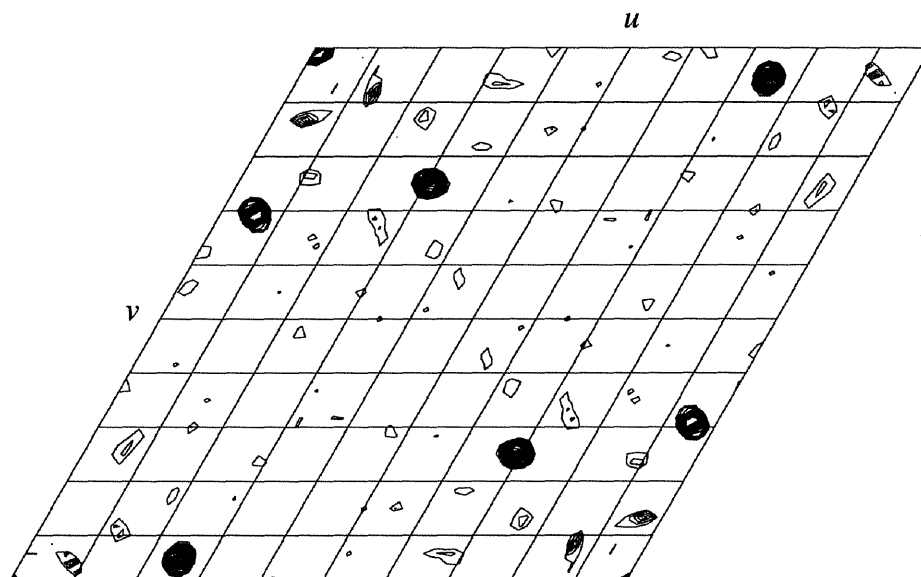


図 2.9 異常分散差パターン図の Hg 誘導体のハーカー面 ($w=0$)
10-5 Å 分解能の反射を用いて計算を行った。

4. 構造解析

4.1. 位相の決定

初期位相の決定は、CCP4 プログラムスーツ (Collaborative Computational Project, Number 4, 1994) の MLPHARE (Otwinowski, 1991) を用い、重原子多重同型置換 (MIR) 法により 3.0 Å 分解能までの反射に対して行った。Hg 誘導体における主要な金属結合部位の位置は、差パターン図から容易に決定することができた(図 2.8a)。この位置を基にして、単一の誘導体を用いた同型置換 (SIR) 法により位相を計算した。得られた位相を用いて差フーリエ図を計算することにより、U 誘導体における重金属結合部位の位置を決めることができた。結合した重金属のパラメーター (位置、含有率と温度因子) を精密化し、これを基にして位相を計算し直した。MIR 法により得られた位相は SIR 法のものより正確であり、この位相を用いて差フーリエ図を再計算することにより、マイナーな金属結合部位を決定することができた。このように、重金属結合部位の決定→パラメータの精密化→MIR 法による位相の計算という一連のルーティンを繰り返し行うことによって、より正確な位相を計算した。こうして得られた位相角の信頼性を表す尺度 Figure of merit (FOM) は、最終的に 0.66 となった。なお、この過程において、Hg 誘導体結晶からの異常分散効果も計算に使用した。

1.8 Å 分解能までの位相拡張および溶媒領域平滑化法とヒストグラムマッピング法とを組み合わせた電子密度修飾による位相の改良は、プログラム DM (Cowtan, 1994) を用いて行った。実際には、本結晶は約 53%の溶媒領域を有するが、溶媒領域平滑化法において分子の境界を決める際の over-estimation を防ぐため、溶媒領域 45%という実際より小さい値を適用した。この処理によって 3.0 Å 分解能までの反射に対する FOM は 0.94 となり位相の大幅な改善がみられた。因に、1.8 Å 分解能までの反射に対する FOM は 0.88 となった。この位相を用いて得られた電子密度図は結晶学的

な非対称単位中の PL-C 二量体構造を示し、主鎖のカルボニル酸素の位置や各々のアミノ酸残基の側鎖までも明瞭に判別できる程、非常に良質なものであった。精密化した重原子パラメータと得られた位相に関する統計学的数値をそれぞれ表 2.6 と表 2.7 に示す。

表2.6 精密化した重原子パラメータ

ATOM	x	y	z	Occupancy	B
Hg1	0.064	0.184	0.000	0.43	17.8
U1	0.204	0.007	0.283	0.30	34.4
U2	0.879	0.085	0.123	0.21	38.1
U3	0.432	0.032	0.064	0.20	40.3
U4	0.645	0.596	-0.009	0.19	41.2
U5	0.616	0.139	0.249	0.12	48.3

表2.7 多重同型置換法による位相計算の統計値

Data set	Hg		U
	isomorphous	anomalous	isomorphous
Used reflections	5,614	5,274	5,298
R_{cullis}^a (acentric reflections)	0.54	—	0.72
R_{ano}^b (acentric reflections)	—	0.80	—
Phasing power ^c	2.48		1.52
Overall figure of merit (MIR+AS) ^d	0.66		

^a R_{cullis} is $\langle \text{lack of closure} \rangle / \langle \text{isomorphous difference} \rangle$. Isomorphous difference is $|F_{\text{PH}} - F_{\text{P}}|$. Lack of closure is $||F_{\text{PH}}| - |F_{\text{P}} + F_{\text{H}}||$ where $|F_{\text{P}} + F_{\text{H}}|$ is a vector sum of the calculated F_{H} , phase ϕ_{H} and F_{P} with the protein phase. For the unweighted averages or rms entries the protein phase is that obtained by the program MLPHARE.

^b R_{ano} is $\langle \text{lack of closure} \rangle / \langle \text{anomalous difference} \rangle$. Anomalous difference is $|F_{\text{PH}}(+)-F_{\text{PH}}(-)|$. Lack of closure is $|\text{Anomalous difference} - \text{Calculated Anomalous difference}|$. Calculated anomalous difference is $2F_{\text{H}}\sin(\phi_{\text{P}})$, where ϕ_{P} is the protein phase.

^cPhasing power is defined as $\langle |F_{\text{H}}| \rangle / \langle E \rangle$, where $\langle |F_{\text{H}}| \rangle$ is the root-mean-square-calculated heavy-atom structure factor amplitude and $\langle E \rangle$ is the root-mean-square lack-of-closure error.

^dThe figure of merit is a measure of the reliability of the phase determination and is defined as $m = \langle \cos \Delta\alpha_i \rangle$, where α_i is the error in the phase angle for reflection i .

4.2. 分子構造モデルの構築及び精密化

分子構造のモデルビルディングをプログラム XtalView (McRee, 1992) の Xfit を用いて行うこととし、DM によって修飾を施した電子密度図に対してコンピュータグラフィックス上で初期モデルを構築した。この段階で、モデルは各々のサブユニットの C 末端 3 残基を除く全ての残基を含み、20–3.0 Å 分解能の反射に対する R 値は 36.3 % となった。

構造の精密化を、プログラム CNS (Brünger et al., 1998) を用いて分子動力学を取り入れたシミュレーテッドアニーリング (SA) 法と制約付き共役勾配最小二乗 (CGLS) 法の組み合わせによって行われた。最初は 20–3.0 Å 分解能の反射のみ用いて行い、徐々に分解能の上限値を 1.8 Å と上げていった。それぞれの精密化サイクルでは、個々の原子の位置及び等方的温度因子の精密化、 $2F_o - F_c$ マップや $F_o - F_c$ マップを用いたモデルの見直し、残余のピークに対する溶媒分子の導入が行われた。また、SA 法における諸条件の検討や精密化の進行状況をモニターするために、ランダムに選んだ全体の 10 % の反射をテストセットとして精密化に用いなかった。精密化の結果、最終的に 20–1.8 Å 分解能の全ての反射に対する R 値は 17.6%、テストセットに対する R 値 (R_{free}) は 20.3% となった。精密化の統計値を表 2.8 に示す。得られた PL-C の原子座標は米国ラトガース大学の RCSB PDB に登録した (PDB code 1ULK)。

表2.8 構造精密化の統計値

Resolution range (Å)	21.5–1.80
Number of reflections	26,091
R_{cryst}^b (%)	17.6 (22.4) ^a
R_{free}^c (%)	20.3 (26.1)
Number of atoms	
Protein	1,884
Water	219
Mean B-factors (Å ²)	
Main-chain	20.5
Side-chain	25.7
Water	32.8
R.m.s.d. from ideal geometry	
Bonds (Å)	0.006
Angles (°)	1.3
Residues in Ramachandran plot ^d	
Most favored (%)	85.5
Additionally allowed (%)	14.0
Generously allowed (%)	0.5

^aValues in parentheses are for the highest resolution shell of 1.91–1.80 Å.

^b $R_{\text{cryst}} = \Sigma ||F_o| - |F_c|| / \Sigma |F_o|$, where $|F_o|$ and $|F_c|$ are the observed and calculated structure factor amplitudes, respectively.

^c R_{free} is calculated against a 10% random sampling of reflections that were removed before the structure refinement.

^dMost favored, additionally allowed, and generously allowed regions are defined with PROCHECK.

【考察】

1. 電子密度図の質および分子構造モデルの信頼性

最終的な $2F_o - F_c$ マップは、全体に渡って非常に良質なものとなった。多くの芳香族環内やプロリン残基の五員環内には、穴が空いているように見える (図 2.10)。

今回得られたモデルは、非対称単位中に、2 つの PL-C サブユニット中の 256 残基を構成する水素原子以外のタンパク質 1,884 原子と 219 個の水の酸素原子を含む。これらのうち 2 つのタンパク質サブユニットは、非結晶学的二回軸によって関係付けられた二量体構造を形成している (図 2.11)。ここで記述を簡便にするため、各々のサブユニットを A 鎖、B 鎖とする。しかしながら、いくつかの側鎖 (Lys47A、Thr126A、Lys88B、Leu124B、Thr126B) は低い電子密度しか持たず、これらの部分のパラメータ精度は低いと考えられる。

Luzzati プロットによって、分子モデル中の原子位置の誤差はおよそ 0.18 Å であると見積もられた (Luzzati, 1952)。このモデルにおける値と、Engh & Fuber によって与えられた各アミノ酸の理想構造からの差の平均二乗根 (r.m.s.d) (Engh & Huber, 1991) は、結合長において 0.006 Å、結合角において 1.3°、improper 角 (3 個以上の非水素原子と共有結合した原子において、二つの共有結合によってできる平面と他の共有結合の間の角度) において 0.76°であった。これらの値は一般的なタンパク質結晶構造における値と比較して標準的な値であることから、PL-C 結晶構造は良好に精密化されていることがわかる。また、Ramachandran プロット (Ramachandran & Sasisekharan, 1968; Kleywegt & Jones, 1996) の結果から、Glu115A (Glu115B) 以外の非グリシン残基の主鎖の二面角 (ϕ , ψ) は、エネルギー的に安定な値をとっていることが分かった (図 2.12)。エネルギー的に望ましくない主鎖コンフォメーションをとっている Glu115A (Glu115B) は、そのカルボニル酸素と Cys118A (Cys118B) のアミド

との間に標準的な Type II β -turn にみられる Oi と Ni+3 間の水素結合を形成することによって安定化している。

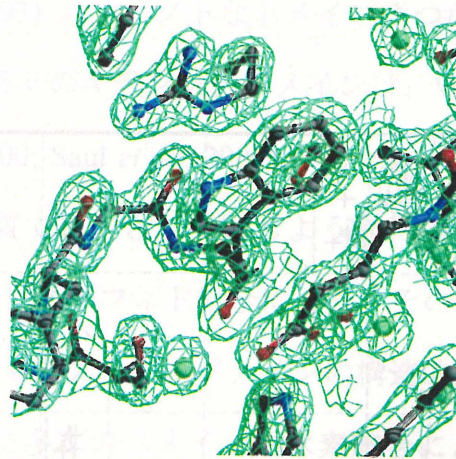


図 2.10 最終的に得られた $2F_o - F_c$ マップ

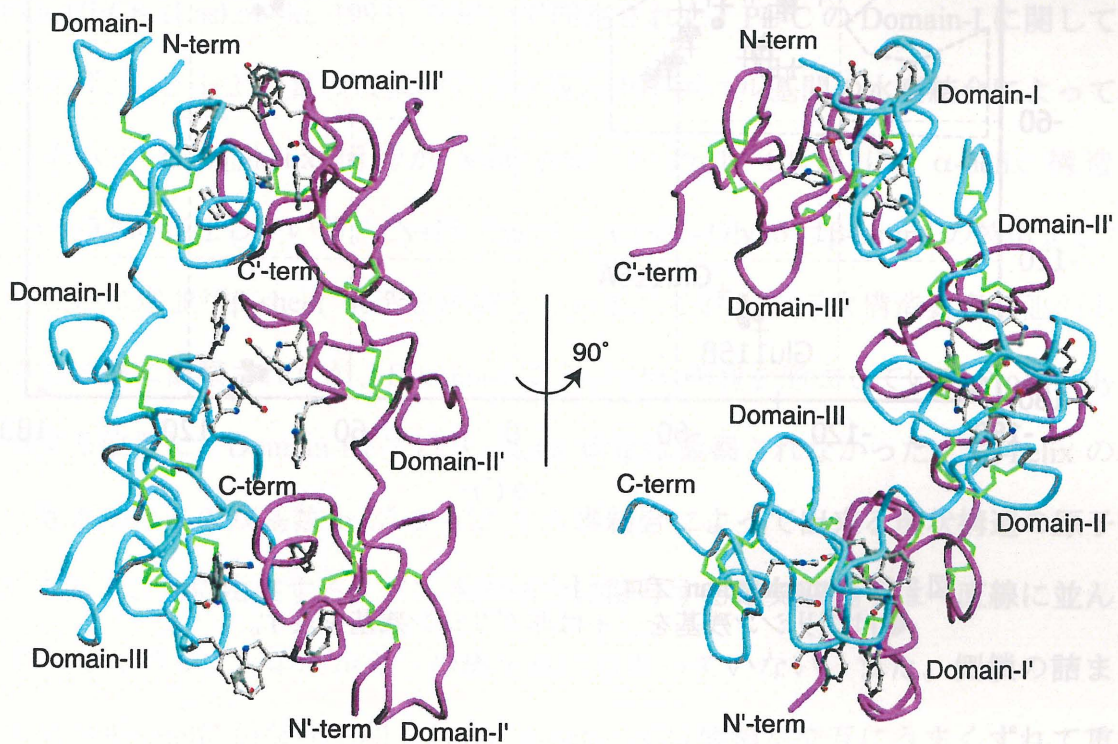


図 2.11 PL-C の全体構造

PL-C の 2 つのサブユニットを、それぞれシアンと薄い紫で色分けしている。ジスルフィド結合を緑で、推定の糖鎖結合残基を ball-and-stick モデルで表示している。左図は、紙面に対して分子二回軸が垂直になる方向から見たもので、右図は分子二回軸が水平方向になるように左図を矢印方向に 90° 回転させて描いた図である。

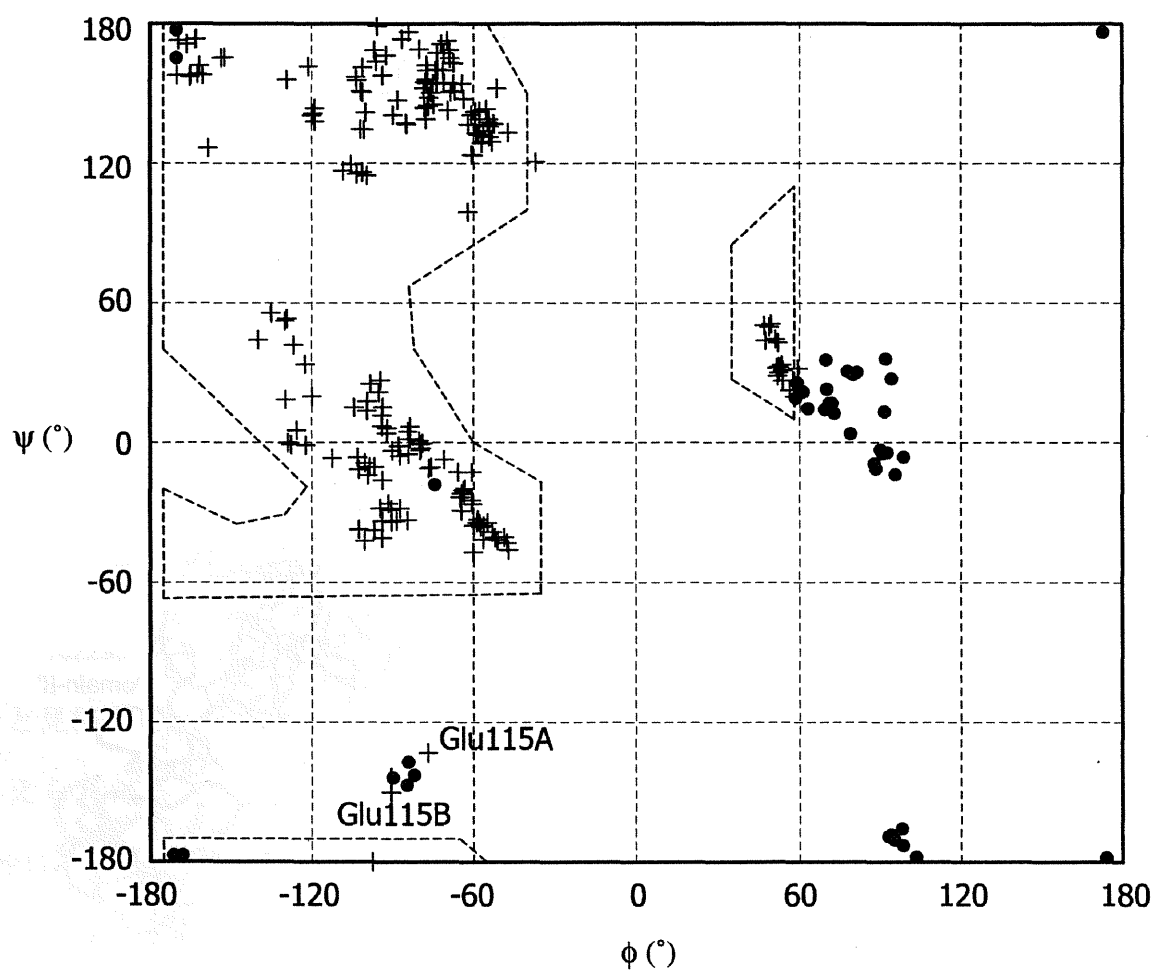


図 2.12 Ramachandran プロット

●はグリシン残基を、+は非グリシン残基を表す。

2. ドメイン構造

非対称単位中の 2 つの PL-C サブユニットは、それぞれキチン結合ドメインと呼ばれる (Raikhel & Lee, 1993) コンパクトなドメイン 3 つから構成される。約 40 程度のアミノ酸残基からなる各々のキチン結合ドメインは、WGA (Wright, 1987, 1989)、UDA (Harata & Muraki, 2000; Saul *et al.*, 2000)、Hevein (Asensio *et al.*, 1995) のような他のキチン結合タンパク質で報告されているように特徴的な二次構造要素を持たないが、保存された 4 つのジスルフィド結合により、その三次元構造は維持されている (図 2.13)。二次構造要素を欠くこのドメインの構造的剛体性は、これらのジスルフィド結合に加え、非常に多くのドメイン内水素結合によって部分的に達成されている (Wright, 1987, 1989)。しかしながら、幾つかの短い二次構造要素が、プログラム PROCHECK (Laskowski, 1993) を用いて同定された。PL-C の Domain-I に関して詳しく言えば、 i と $i+2$ 番目の残基のアミド基とカルボニル基間の水素結合によって安定化されている 3_{10} -helix 構造が Val6-Ala8 と Pro14-Gly16 に、 α -helix 構造は Glu29-Cys32 に存在している。Cys18-Cys19 と Cys25-Gly26 は β -strand の特徴をもち、両者は互いに逆並行 β -sheet 構造を形成している。これらの二次構造要素は他のドメインでも同様に観察されたが、Domain-I で 3_{10} -helix 構造を形成している Pro14-Gly16 に相当する位置に、Domain-III では 3_{10} -helix 構造は観察されなかった。 3_{10} -helix の名前は一卷きあたりの残基数 n が 3 であり水素結合によって出来る環状構造の原子数が 10 であることに由来する。この水素結合に関与する電気双極子は一直線に並んでおらず、したがって、エネルギーの極小点にはなっていない。また、側鎖の詰まり方もエネルギー的にかなり不利である。 α -helix では側鎖が交互にうまくずれて重ならないようになっているのに対し、 3_{10} -helix では側鎖が互いに重なり合うように配列している。さらに、 3_{10} -helix は、Ramachandran プロットにおける (ϕ, ψ) 角の許容領域の境界近くに位置するため、立体障害による多少のひずみがある。 3_{10} -helix がタンパ

ク質中でまれにしか見られない理由は、このようにエネルギー的に不利な幾何学的形状をとっているからと理解されうる。Domain-I と Domain-II の 3_{10} -helix 構造を形成している Pro14-Asp15-Gly16 および His55-Asp56-Glu57 配列内の Asp は、Domain-III では Thr96-Glu97-Asp98 のようにより側鎖のかさ高い Glu に置換されており、その結果、大きな立体障害を生じるため、Domain-III のこの領域は 3_{10} -helix 構造を形成することが出来ないのだろう。

種々のキチン結合タンパク質のこれまでの X 線結晶構造解析の結果から、糖鎖結合に関与すると予測される芳香族アミノ酸残基は、ドメイン内で 22、24、31 番目に位置し芳香族トライアドを形成している。芳香族トライアドが存在するループ (Domain-I では Cys18-Cys32) はドメインの中心に位置し、保存された 4 つのジスルフィド結合のうち 3 つがこのループの安定化に寄与している (第二章にて詳細に記述)。この 3 つのジスルフィド結合が入れ子状になった領域は "inner core region" と呼ばれ¹¹⁾、Ac-AMPs ではこの領域のみを構造単位としてもつため、種々のキチン結合タンパク質はこれから進化したと考えられる。

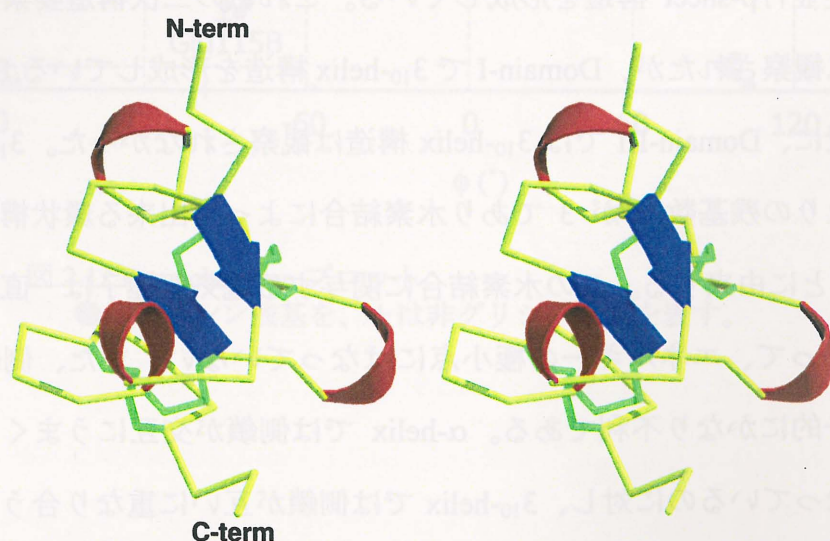


図 2.13 キチン結合ドメインの三次元構造 (ステレオ図)

このドメインは PL-C のサブユニット A の Domain-I を示している。
ヘリックスおよび β -ストランドを、それぞれ赤のリボンおよび青の矢印で表示している。ジスルフィド結合を緑色で示している。

3. PL-C 二量体構造

PL-C 結晶の非対称単位中に存在する 2 つのサブユニットは、非結晶学的二回軸により関係付けられている。2 つのサブユニットは、それらの主鎖の流れが互いに逆方向となった “head-to-tail” の様式で並んでいる (図 2.11)。

全てのタンパク質原子における温度因子の平均値は 22.4 \AA^2 、主鎖に限れば 20.3 \AA^2 と小さな値である。また、個々のサブユニットに関して言えば、A 鎖、B 鎖に含まれる全てのタンパク質原子ではそれぞれ 23.5 \AA^2 および 21.4 \AA^2 、主鎖ではそれぞれ 21.8 \AA^2 および 18.9 \AA^2 と B 鎖の方の温度因子は低い。このことは、B 鎖の方が結晶学的に等価なより多くの分子と相互作用をすることでより安定な構造を形成している結果と考えられる。

一つのサブユニットに存在する三つの糖鎖結合部位は、分子の片側に集中しており、相手サブユニットの三つの糖鎖結合部位と向かい合ってそれぞれ対をなしている。それ故、全ての糖鎖結合部位は二量体の境界面に位置付けられている (図 2.11)。PL-C の二量体構造は、主に両サブユニット由来の糖鎖結合部位同士の疎水的相互作用およびサブユニット間に存在する若干の水素結合により安定化されている。以下にサブユニット間の相互作用について詳細に述べる。

プログラム Ligplot (Wallace et al., 1995) によって書かれた図 2.14 に、PL-C サブユニット境界面における相互作用を示す。糖鎖結合部位同士による相互作用は、A 鎖の Domain-IA (N 末端側)、Domain-IIA、及び Domain-IIIA (C 末端側) が各々 B 鎖の Domain-IIIB (C 末端側)、Domain-IIB、及び Domain-IB (N 末端側) との間で形成されている。2 つのサブユニットは、非結晶学的二回軸で関係付けられており、加えて N 末端と C 末端がサブユニット間で逆方向に並んでいるため Domain-IA と Domain-IIIB の相互作用は、若干の違いを除いて Domain-IIIA と Domain-IB のそれとほとんど同じである。Domain-IA と Domain-IIIB (Domain-IIIA と Domain-IB) において、糖鎖結

合に直接関与するとされる保存された芳香族残基の側鎖が疎水的な環境を作りだしている。Domain-IA (Domain-IB) の Trp22A (Trp22B) のインドール環と Domain-IIIB (Domain-IIIA) の Tyr104B (Tyr104A) の芳香族環は π - π 電子によるスタッキング相互作用を形成している。Trp106A (Trp106B) のインドール環は Glu30B (Glu30A) 側鎖のメチル基と CH- π 相互作用を形成している。この Glu30B (Glu30A) の側鎖のカルボニル酸素は、これも同じく糖鎖の結合に関与するとされる His113A (His113B) のイミダゾール環の窒素と静電的相互作用を形成している。Domain-IA/Domain-IIIB 間と Domain-IIIA/Domain-IB 間の相互作用における唯一の違いは水素結合にある。Domain-IA/Domain-IIIB 間では、前述の Glu30A と His113B 間の水素結合に加え、Arg7A と Tyr104B の間にも水素結合が形成されている。Domain-IIA と Domain-IIB との間でも糖鎖結合に関与する芳香族アミノ酸により疎水的な環境が作りだされている。ここでも Tyr 63 同士による芳香族環のスタッキング相互作用が観測される。このように 2 つのサブユニットの全ての糖鎖結合部位が二量体構造の形成に関与しているため、各ドメインの糖鎖結合部位には糖鎖を収容するための空間はない。

PL-C は、ゲルろ過の際、塩酸グアニジンの存在下・非存在下で異なる分子量で流出する (Yamaguchi, 1997)。塩酸グアニジン非存在下では二量体に相当する分子量 21,000 で流出するのに対し、存在下では単量体に相当する分子量 12,000 で流出する。塩酸グアニジンはタンパク質の変性剤として用いられるが、そのタンパク質を変性させる原因は、分子平面を π 電子に覆われたグアニジウムイオンが、タンパク質の疎水性残基と疎水的相互作用をするためと一般的に考えられている。今回得られた PL-C 二量体構造に基づくと、PL-C 二量体形成に関与する疎水性残基とグアニジウムイオンが相互作用することによって、2 つのサブユニット間の糖鎖結合部位における疎水的環境が壊されたために上記のような現象が起きたものと考えられる。よって、本 PL-C 結晶構造は溶液中での二量構造を反映しているものと考えられる。

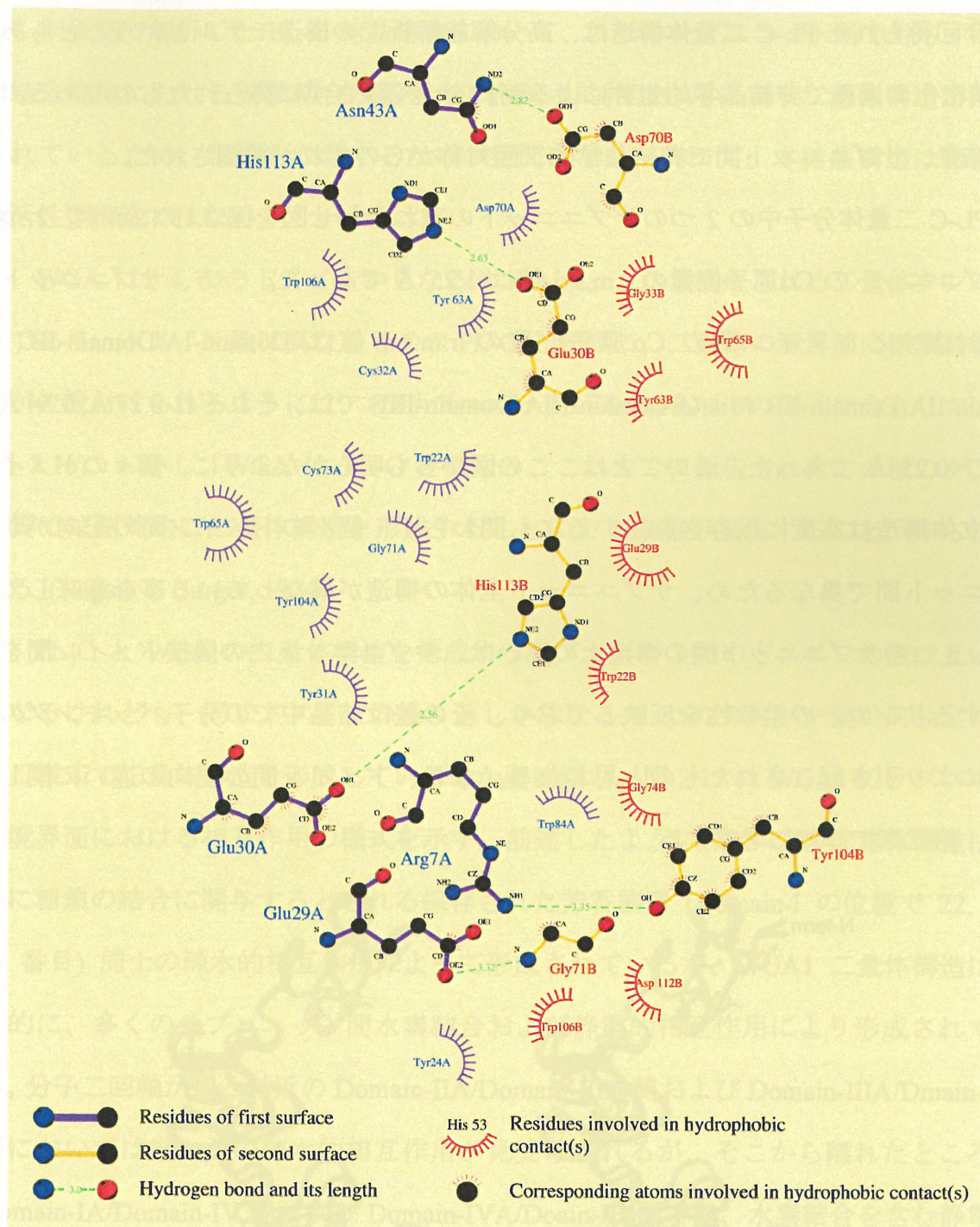


図 2.14 PL-C 二量体構造におけるサブユニット間相互作用

4. 分子内対称からのずれ

今回得られた PL-C 二量体構造は、高分解能解析での構造モデルということもあり、精密化の過程で非結晶学的対称による制約を全く課さずに得られたものである。その結果、サブユニット間で非結晶学的二回対称からのずれが観測された。

PL-C 二量体分子中の 2 つのサブユニットの重ね合わせ図を図 2.15 に示す。2 つのサブユニットの $C\alpha$ 原子位置の r.m.s.d 値は 1.25 Å であった。一方、サブユニット間の対応するドメイン間の $C\alpha$ 原子位置の r.m.s.d 値は Domain-IA/Domain-IB、Domain-IIA/Domain-IIB および Domain-IIIA/Domain-IIIB では、それぞれ 0.27 Å, 0.54 Å および 0.25 Å であった。このことは、この図からも明らかなように、個々のドメインの立体構造は高度に保存されているにも関わらず、個々のドメイン間の配向がサブユニット間で異なるため、サブユニット全体の構造が異なっている事を意味している。2 つのサブユニット間の構造上の違いは、サブユニット内の隣接ドメイン間を連結するリンカーの柔軟性を反映しており、その差は結晶中での分子パッキングの違いにより引き起こされたものと思われる。なお、ドメイン間の配向の違いに関しては、第三章で詳細に考察する。

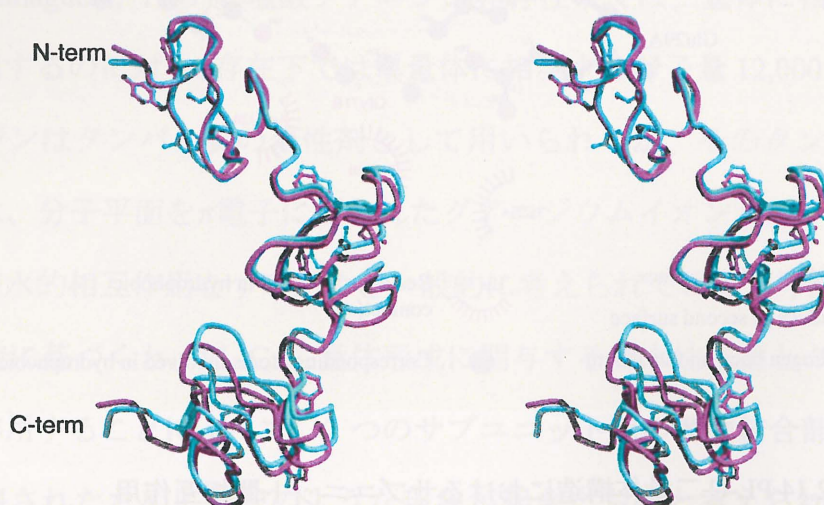


図 2.15 分子二回軸からのずれ (ステレオ図)

2 つのサブユニットの色分けは図 2.11 と同じである。この重ね合わせは両サブユニットの Domain-I の $C\alpha$ 原子同士の間で行われた。

5. 糖鎖結合における二量体構造の必然性

本研究で解析した PL-C 結晶構造において、2 つのサブユニット間で対応する糖鎖結合部位における糖鎖結合残基を介した疎水的相互作用により二量体構造が形成されているため、糖鎖を収容するための空間はない。従って、本結晶構造は糖鎖結合活性型構造ではない。

WGA は、4 つのドメインからなるサブユニットから構成される二量体タンパク質であり、ドメイン数は異なるものの PL-C と同様に、二量体の境界面に糖鎖結合部位が位置付けられるように 2 つのサブユニットが“head-to-tail”の様式で会合している (図 2.16)。しかし、WGA は PL-C と異なり、これまでに報告されたこの種のタンパク質では例外的に二量体構造を形成することにより機能を発現することが知られている (Nagata & Burger, 1974)。

PL-C と WGA の二量体構造を構成するサブユニット内のドメインの数は互いに異なるけれども、同じドメインの繰り返しからなる 2 つのタンパク質が何故全く異なる様式で二量体構造を形成しているのか興味深い。図 2.17 に WGA1 のサブユニット境界面における相互作用の様式を示す。前述したように、PL-C の二量体構造は、主に糖鎖の結合に関与するとされる保存された芳香族環 (Domain-I の位置で 22, 24, 31 番目) 同士の疎水的相互作用によって形成されているが、WGA1 二量体構造は対照的に、多くのサブユニット間水素結合および静電的相互作用により形成されている。分子二回軸が通る付近の Domain-IIA/Domain-IIIB 間および Domain-IIIA/Domain-IIIB 間においては幾つかの疎水的相互作用が見受けられるが、そこから離れたところの Domain-IA/Domain-IV 間および Domain-IVA/Domain-IB 間では、水素結合を含む静電的相互作用がドメイン間相互作用の大部分を占めているのがわかる。ここで重要なことは、PL-C と異なり各ドメインに存在する糖鎖結合残基が WGA1 の二量体構造形成に関与していないことである。WGA1 の糖鎖結合部位は分子表面上に配置され、

リガンドは 2 つのサブユニットの間に形成される溝に容易に入り込むことが可能となっている。この溝は各ドメイン対の糖鎖結合部位によって形成されているため、以前はこのファミリーにおいて二量体構造の形成が糖鎖の結合に対して必須であると考えられていた。しかしながら、別の WGA_糖鎖複合体の結晶構造から、単一のドメインでも糖鎖の結合は可能であることが示された (Wright, 1984, 1992)。更に、一つのキチン結合ドメインからなる Hevein は、単量体でキチンに結合することも明らかにされている (Van Parijs *et al.*, 1991)。現在、このファミリーにおいて、WGA の結晶構造で観察された二量体構造は、糖鎖の結合に必須ではないと結論付けられている (Raikhel & Lee, 1993; Wright, 1992)。

WGA は pH に依存して単量体あるいは二量体で存在することが報告されている (Nagata & Burger, 1974)。また、他の多くのレクチンにおいても、濃度や pH 等により弱く会合したオリゴマーを形成することが報告されている (Kalb & Lusting, 1968; Fish *et al.*, 1978; Decastel *et al.*, 1985)。多くのレクチンの立体構造が決定されている現在、四次構造の多様性が細胞の架橋やそれに続いて引き起こされる生体反応の制御因子としての役割を果たしているかもしれないということが指摘されている (Chandra *et al.*, 1999; Hamelryck *et al.*, 2000; Buts *et al.*, 2001)。PL-C が赤血球凝集能を示さないのは、糖鎖結合部位を介した自己会合により糖鎖結合能を失った結果であると考えられるが、*in vivo* において濃度や pH 等に依存した PL-C の単量体_二量体間の動的平衡が存在し、そのことが PL-C が機能を発揮する上での調節因子として働くのかもしれないという可能性は否定できない。PL-C の二量体構造がそのような因子に依存するのかは、今後の研究課題の一つである。

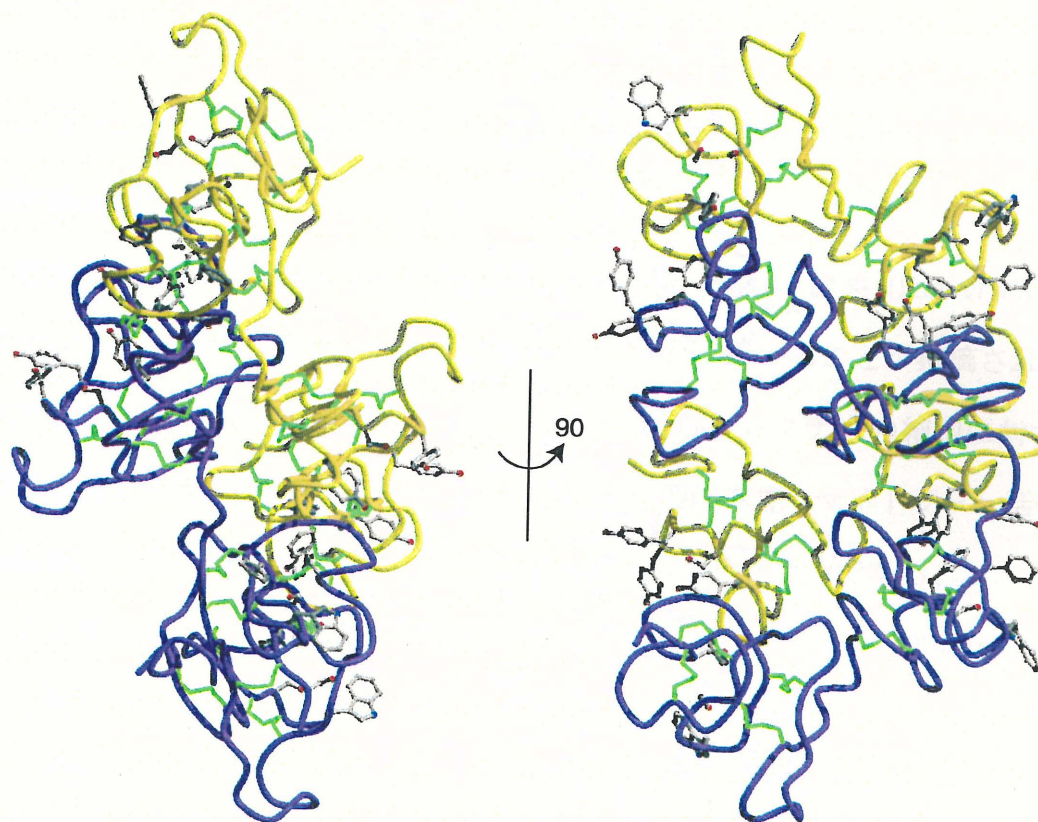


図 2.16 WGA1 の全体構造

WGA1 の 2 つのサブユニットを、それぞれ紫と黄色で色分している。ジスルフィド結合を緑で、糖鎖結合残基を ball-and-stick モデルで表示している。左図は、紙面に対して分子二回軸が垂直になる方向から見たもので、右図は分子二回軸が水平方向になるように左図を矢印の方向に 90°回転させて描いた図である。

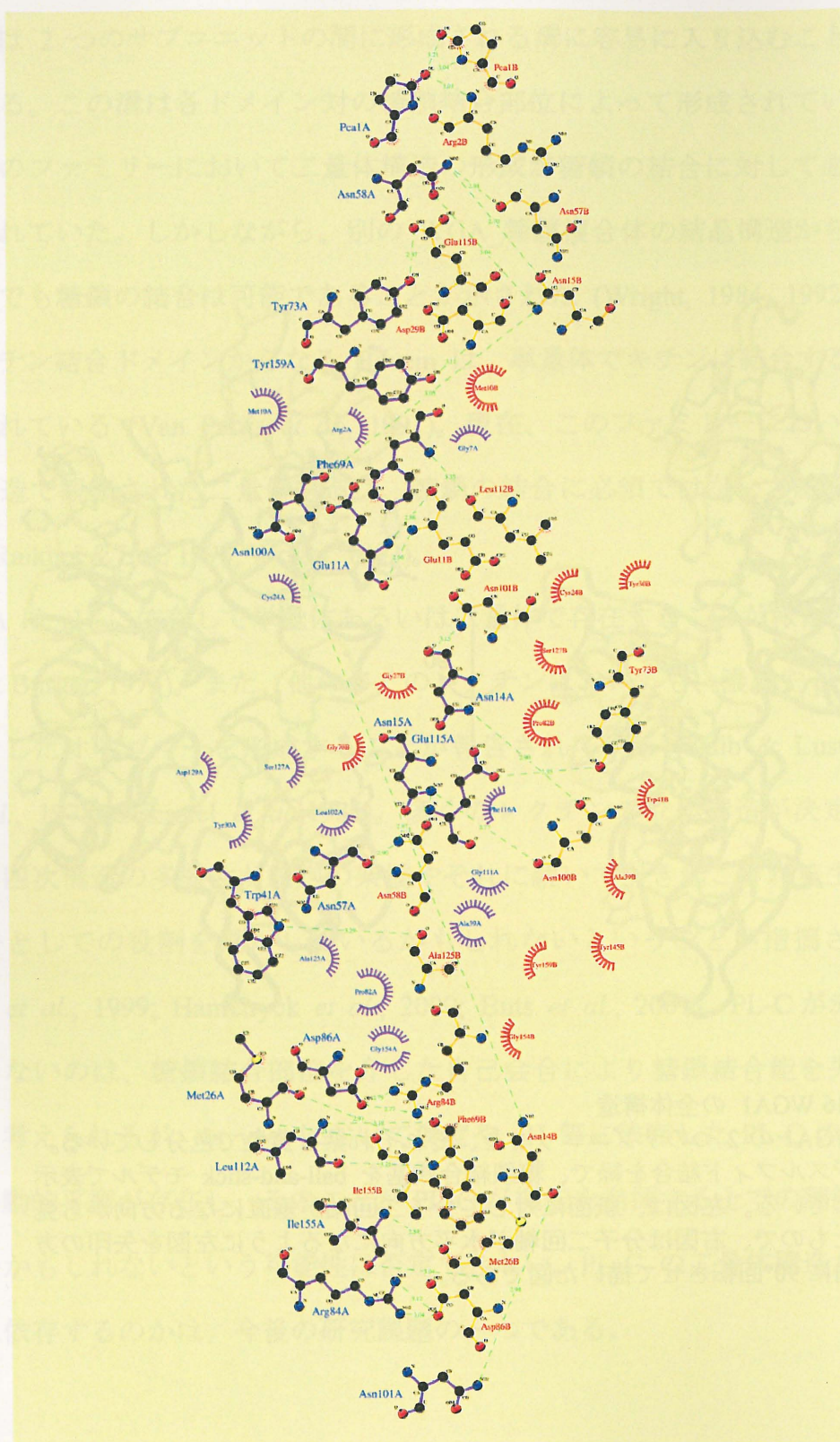


図 2.17 WGA 二量体構造におけるサブユニット間相互作用
図中の表記は図 2.14 と同じ。

第三章 PL-Ds の X 線結晶構造解析

【緒言】

レクチンには、赤血球凝集活性の他にがん細胞特異的凝集活性 (Aub *et al.*, 1963) や細胞障害活性 (Ishiguro *et al.*, 1964) など様々な生理活性が見出されている。また近年、溶血活性 (Hatakeyama *et al.*, 1994, 1995)、アポトーシス誘導 (Kim *et al.*, 1993)、免疫グロブリン産生調節 (Lim *et al.*, 1994) にも関わっていることが指摘されており、レクチンの多機能性に注目が集まっている。これらのレクチンの細胞に対する生理活性の中で最も画期的なものの一つにリンパ球分裂促進能 (マイトジェン活性) が挙げられる。本研究対象とした PL 分子はマイトジェンレクチンである。

アメリカヤマゴボウ根茎から単離された 2 つのイソレクチン (PL-D1, PL-D2) は、それぞれ 2 つのキチン結合ドメインから構成され、この種のレクチンの中では最小のレクチンである。PL-D2 が PL-D1 の C 末端 2 残基 (Leu83_Thr84) を欠如していることを除き、両者の一次構造は同一である。PL-D1 と PL-D2 は共に同程度の赤血球凝集能を示すにも関わらず、二残基短い PL-D2 のみがマイトジェン活性を示す (Yamaguchi *et al.*, 1997)。そこで、PL-D1 と PL-D2 のマイトジェン活性の差に着目した構造生物学的研究を行った。本章ではその結果について述べる。また、アメリカヤマゴボウレクチンの研究は、そのマイトジェン活性に焦点が集まっていたこともあり、その糖特異性が分かってきたのは比較的最近のことである。PL-D2 に関しては、糖鎖複合体の構造解析も行い、その結晶構造に基づいて糖鎖特異性および 2 つのドメイン間の糖鎖結合能の違いを示唆する知見も得られたので併せてこの章で記述する。また、前章で述べた PL-C 二量体構造におけるタンパク質間相互作用と PL-

D2 糖鎖複合体構造におけるタンパク質-糖鎖間相互作用の類似性についてもこの章に記す。

【実験方法および結果】

1. PL-D1

1.1. 結晶化

PL-D1 試料は、九州大学農学研究院遺伝子資源工学研究室において、アメリカヤマゴボウの根茎から単一タンパク質として精製され、凍結乾燥標本として供与されたものである。凍結乾燥サンプルを 50 mM Tris-HCl バッファー (pH 7.5) でタンパク質濃度 5 mg/ml となるように溶かしたのち遠心分離し、その上清を結晶化用試料とした。

PL-D1 の結晶化は、PL-C 結晶と同様にハンギングドロップ蒸気拡散法を用いて同じ手順に従って行った。最初の結晶は、30%(w/v) PEG8000 と 0.2 M 酢酸ナトリウムを含む 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.5) を沈殿剤溶液として用いたときに得られた。できた結晶は微結晶が幾つか集まって塊となっていたので、これを針で粉々にしたものを種結晶とし、それを沈殿剤溶液で 5000 倍に希釈してマイクロシーディング法を行った。マイクロシーディング法により単結晶が得られるようになったが、結晶どうしが重なり結晶表面が乱れることが多かった。そこで Additive Screen による添加剤の検討を行った結果、6-Aminocaproic Acid あるいは Xylitol を添加剤とした際に結晶の重なりがほぼ抑えられた。このマイクロシーディング法と添加剤とを組み合わせると、微結晶は一日で観察され、1～2 週間後ぐらいまで結晶は成長を続けた。前述の沈殿剤溶液に最終濃度 2% となるように 6-Aminocaproic Acid を加

え、そのドロップ中にできた結晶を実際の測定に使用した (図 3.1)。しかしながら、結晶をリザーバー溶液中に移すと結晶が徐々に劣化していき、室温におけるキャピラリーへの封入による測定はなかなかうまくいかなかった。そのため、クライオ実験による測定を試みた (後述)。

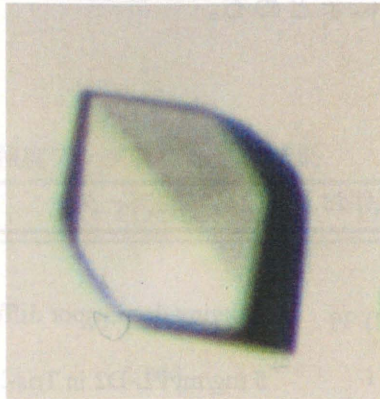


図3.1 PL-D1結晶の顕微鏡写真
結晶はおよそ $0.1 \times 0.1 \times 0.02$ mm
の大きさまで成長した。

1.2. 結晶学的パラメータの決定

X 線回折実験は、高エネルギー加速器研究機構 物質構造科学研究所 放射光研究施設のビームライン BL6A にて、波長 1.000 \AA の X 線を用いて行った。また、回折強度は、 2×2 アレイ型 CCD 検出器 (ADSC 社製 Quantum4) で測定した。

前述したように、PL-D1 結晶は、リザーバー溶液中に移すと結晶が徐々に劣化していくため、室温でのキャピラリーへの封入による測定はうまくいかなかった。そこで、クライオ実験による測定を試みた。20%(w/v) PEG400 を含む PL-D1 沈殿剤溶液 (20%(w/v) PEG400, 27%(w/v) PEG8000, 0.18 M NaAcetate, 0.09 M リン酸ナトリウムバッファー、2.7% xylitol) に数十秒漬けた結晶をナイロンループ (太さ $20 \mu\text{m}$ 、直径 $0.1 \sim 0.2 \text{ mm}$) ですくい、100K ($-173 \text{ }^\circ\text{C}$) の液体窒素気流中で瞬間冷却し、これをそのままデータ測定に用いた。

本結晶は 1.6 \AA 分解能まで回折点を与え、プログラム DPS/MOSFLM (Leslie, 1992; Evans, 1993) を用いた auto-indexing の結果、斜方晶系に属し、空間群は $P2_12_12$ 、格子定数は $a=48.7 \text{ \AA}$, $b=49.0 \text{ \AA}$, $c=29.9 \text{ \AA}$ と求められた。本結晶の非対称単位中に PL-D1 が一分子含まれていると仮定すると、 V_M は $1.92 \text{ \AA}^3\text{Da}^{-1}$ 、溶媒含量は 36% となり、タンパク質結晶として妥当な値を与える。よって Z は 4 であると決定した。PL-D1 結晶の結晶学的パラメータを表 3.1 にまとめる。

表3.1 PL-D1結晶の結晶化条件および結晶学的データ

<i>Crystallization Conditions</i>	
Method	hanging drop vapor diffusion
Protein solution	5 mg/ml PL-D2 in Tris-HCl (pH 7.5)
Precipitant	30%(w/v) PEG8000
	0.2 M Na-acetate
	0.1 M Na-phosphate (pH 6.5)
Temperature	25 °C
<i>Crystallographic Data</i>	
Space group	$P2_12_12$
Lattice parameters	$a = 48.7 \text{ \AA}$, $b = 49.0 \text{ \AA}$, $c = 29.9 \text{ \AA}$
Z	4
V_M	$1.92 \text{ \AA}^3\text{Da}^{-1}$
Solvent contents	35%

1.3. 回折強度測定

結晶から CCD までの距離を 100 mm、1 フレームあたりの露光時間を 60 秒、振

動角を 1.0° に設定して、 1.6 \AA 分解能までのデータ測定を行った。計 180 フレームを処理した結果、全体で 61,545 個の反射を観測することができた。個々のフレームのスケール因子を計算し、等価な反射をマージした結果 9,068 個の独立反射を得ることができた。データの完全性は 99.8%、 R_{merge} は 4.9% であった。PL-D1 のデータ収集と処理の統計値を表 3.2 に示す。

表3.2 PL-Ds結晶の回折強度データ収集と処理結果

Data set	PL-D1	PL-D2	Complexed PL-D2
<i>Data collection</i>			
X-ray source	PF (BL-6A)	PF (BL-6A)	PF (BL18B)
Wavelength (\AA)	1.000	1.000	1.000
Max. resolution (\AA)	1.65 (1.75–1.65) ^a	1.50 (1.55–1.50)	1.80 (1.91–1.80)
Number of reflections			
Observation	61,545	57,637	54,643
Unique	9,068	11,513	14,699
Redundancy	6.8	5.0	3.7
Completeness (%)	99.8 (99.8)	98.5 (95.4)	98.4 (97.4)
R_{merge}^b (%)	4.9 (8.0)	3.1 (12.7)	6.3 (34.2)

^a Values in parentheses refer to the highest resolution shell.

^b $R_{\text{merge}} = \sum_i |I_i - \langle I_i \rangle| / \sum_i I_i$, where $\langle I_i \rangle$ is the average of I_i over all symmetry equivalents.

1.4. 構造解析および精密化

CCP4 プログラムスーツ (Collaborative Computational Project, Number 4, 1994) のプログラム MOLREP (Vagin & Teplyakov, 1997) を用いて、先に 1.5 \AA 分解能で決定した糖鎖非結合型 PL-D2 の構造 (後述) を初期モデルとして分子置換法による PL-D1

の構造決定を行った。まず、単位格子内での分子の配向を決めるため、10-4 Å 分解能の反射を用いてクロス回転関数を計算したところ、($\theta = 125.5^\circ$, $\phi = 135.4^\circ$, $\chi = 120.5^\circ$)に 5.0 σ のピークを持つ解を得た。この得られた解に相当する変換操作によって分子の配向を決定したあと、この配向を保ったまま分子を並進させて単位格子内での位置を決定するため並進関数を計算した。(x = 0.667, y = 0.017, z = 0.344)の位置にモデルを動かした時 13.3 σ の有意なピークが観測されたため、この解を正しい解とし以下の精密化を行った。

精密化にはプログラム CNS (Brünger et al., 1998) を用いた。PL-D2 分子の構造解析の結果から、個々のドメイン間を連結するリンカーの柔軟性によりドメイン間の配向には自由度があることが予測される (後述) ため、2 つのドメインを 1 つの剛体ではなく、2 つのドメイン各々を 1 つの剛体とみなして剛体近似精密化を行った。また、個々の原子の精密化を、CNS (Brünger et al., 1998) による SA 法と CGLS 法の組み合わせによって行った。最初は、40-3.0 Å 分解能の反射のみ用いて精密化を行い、徐々に上限の値を 1.65 Å 分解能まで上げていった。それぞれの精密化サイクルには、個々の原子の位置および等方性温度因子の精密化、 $2F_o - F_c$ マップや $F_o - F_c$ マップを用いたモデルの見直し、残余のピークに対する溶媒分子の導入が含まれた。プログラム XtalView (McRee, 1992) の Xfit を用いてモデルビルディングを行った。また、精密化の進行状況をモニターするために、ランダムに選んだ全体の 10% の反射をテストセットとして精密化に用いなかった。最終的に、1.65 Å までの全ての反射に対する R 値は 17.2% となった。精密化の統計値を表 3.3 に示す。得られた PL-D1 の原子座標を米国ラトガース大学の RSCB PDB に登録した (PDB code 1ULN)。

表3.3 PL-Dsの構造精密化の統計値

	PL-D1	PL-D2	Complexed PL-D2
Resolution range (Å)	40–1.65(1.75–1.65) ^a	40–1.5(1.55–1.50)	24.2–1.80(1.91–1.80)
Number of reflections	90,68	11,513	14,699
R_{cryst}^b (%)	17.2(17.6)	17.6(22.1)	19.5(24.8)
R_{free}^c (%)	20.5(24.7)	20.7(25.7)	23.4(29.9)
Number of atoms			
Protein	622	623	1,246
tri- <i>N</i> -acetylchitotriose	-	-	86
Ca ²⁺	-	1	-
Water	129	81	122
Mean B-factors (Å ²)			
Main-chain	10.3	15.0	24.1
Side-chain	13.8	19.1	31.9
tri- <i>N</i> -acetylchitotriose	-	-	31.9
Ca ²⁺	-	12.4	-
Water	24.7	29.1	37.1
R.m.s.d. from ideal geometry			
Bonds (Å)	0.004	0.004	0.006
Angles (°)	1.3	1.2	1.2
Residues in Ramachandran plot ^d			
Most favored (%)	78.5	86.2	85.4
Additionally allowed (%)	21.5	13.8	13.1
Generously allowed (%)	0.0	0.0	1.5

^aValues in parentheses are for the highest resolution shell.

^b $R_{\text{cryst}} = \sum ||F_o| - |F_c|| / \sum |F_o|$, where $|F_o|$ and $|F_c|$ are the observed and calculated structure factor amplitudes, respectively.

^c R_{free} is calculated against a 10% random sampling of reflections that were removed before the structure refinement.

^dMost favored, additionally allowed, and generously allowed regions are defined with PROCHECK.

2. PL-D2

2.1. 結晶化

PL-D2 の結晶化には、九州大学農学研究院遺伝子資源工学研究室において、アメリカヤマゴボウの根茎から単一タンパク質として精製され、凍結乾燥標本として供与されたものを用いた。凍結乾燥サンプルを 0.1M Tris-HCl バッファー (pH7.5) でタンパク質濃度 10 mg/ml となるように溶かしたのち遠心分離し、上清を結晶化用試料とした。

PL-D1 の結晶化も PL-C 結晶と同様にハンギングドロップ蒸気拡散法を用いて同じ手順に従って行った。最初の結晶は、18%(w/v) PEG8000 と 0.2 M 酢酸カルシウムを含む 0.1 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.6) を沈殿剤溶液として用いたときに得られた。得られた結晶の表面は乱れていたため結晶を針で潰して種結晶とし、沈殿剤溶液で 1000 倍に希釈した溶液 1 μ l を 10 mg/ml PL-D2 タンパク質溶液 20 μ l に混合して調製した溶液を 25°C で静置してバッチ法で結晶化を行った。ハンギングドロップ蒸気拡散法やバッチ法でも、タンパク質溶液とリザーバー溶液とを混合した直後に白濁したが、時間の経過とともに濁りが少なくなり結晶が析出した。シーディング法を適用すると微結晶は一日で析出し、1～2 週間後ぐらいまで結晶は成長を続けた。重なりあった結晶が多かったが、なかにはきれいなものもあり、そのなかから良好な結晶を注意深く選びだして回折実験に使用した(図 3.2)。

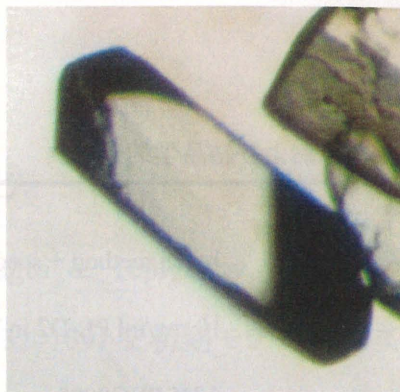


図3.2 PL-D2結晶の顕微鏡写真
結晶はおよそ $0.1 \times 0.1 \times 0.02$ mm
の大きさまで成長した。

2.2. 結晶学的パラメータの決定

X 線回折実験は、高エネルギー加速器研究機構 物質構造科学研究所 放射光研究施設のビームライン BL6A において、波長 1.000 \AA のシンクロトロン放射光を用いて行った。回折強度は、巨大分子用ワイゼンベルグカメラに装着した $400 \times 800 \text{ mm}$ の IP で検出した。

本結晶は 1.5 \AA 分解能まで回折点を与え、プログラム DPS/MOSFLM (Leslie, 1992; Evans, 1993) を用いた auto-indexing の結果、単斜晶系に属し、空間群は $P2_1$ 、格子定数は $a = 23.2 \text{ \AA}$, $b = 57.0 \text{ \AA}$, $c = 29.6 \text{ \AA}$, $\beta = 109.3^\circ$ と求められた。本結晶の非対称単位中に PL-D2 が一分子含まれていると仮定すると、 V_M は $2.04 \text{ \AA}^3 \text{ Da}^{-1}$ 、溶媒含量は 40% となり、タンパク質結晶として妥当な値を与える。よって Z は 2 であると決定した。PL-D2 結晶の結晶学的パラメータを表 3.4 にまとめる。

表3.4 PL-D2結晶の結晶化条件および結晶学的データ

<i>Crystallization Conditions</i>	
Method	batch method + seeding
Protein solution	10 mg/ml PL-D2 in Tris-HCl buffer (pH7.5)
Precipitant	18% PEG8000 0.2 M Ca-acetate 0.1 M Na-acetate (pH 4.6)
Temperature	25 °C
<i>Crystallographic Data</i>	
Space group	$P2_1$
Lattice parameters	$a = 23.2 \text{ \AA}$, $b = 57.0 \text{ \AA}$, $c = 29.6 \text{ \AA}$ $\beta = 109.3^\circ$
Z	2
V_M	$2.04 \text{ \AA}^3 \text{Da}^{-1}$
Solvent contents	39%

2.3. 回折強度測定

PL-D2 のデータ収集を 1 つの結晶を用いて 2 軸方向に対して行い、得られた 2 つのデータセットをマージしたものを以後の解析に用いた。結晶から IP までの距離を 100 mm、1 フレームあたりの露光時間を 60 秒、振動角を 1.0° に設定して、 1.5 \AA 分解能までのデータ測定を行った。計 180 フレームを処理した結果、全体で 57,613 個の反射を観測することができた。個々のフレームにおけるスケール因子を計算し、等価な反射をマージした結果 11,513 個の独立反射を得ることができた。データの完全性は 98.5%、 R_{merge} は 3.1%であった。PL-D2 のデータ収集と処理の統計値を表 3.2

に示す。

2.4. 構造解析および精密化

プログラム MOLREP (Vagin & Teplyakov, 1997) を用いて、WGA3 (PDB code 1WGT) の Doma in-IV (残基 132–169) を初期モデルとして分子置換法を行った。PL-D2 結晶の V_M 値の見積りから、非対称単位中に PL-D2 が 1 分子存在することが予測されたため、ドメイン 2 個が非対称単位中にあるとして、単位格子内での配向と位置を決めるために回転関数と並進関数の計算を行った。 $(\theta = 17.7^\circ, \phi = -83.9^\circ, \chi = 119.9^\circ)$ と $(\theta = 150.72^\circ, \phi = 61.36^\circ, \chi = 162.8^\circ)$ にそれぞれ 5.4σ および 3.7σ のピークが観察された。これらの解に対してそれぞれ並進関数を計算したところ、前者の解に対しては $(x = 0.270, y = 0.000, z = 0.151)$ 、後者の解に対しては $(x = 0.741, y = 0.229, z = 0.809)$ の位置にそれぞれ 7.7σ および 4.6σ のピークが観察された。得られた解に対応する変換操作によって片方のドメインの C 末端ともう一方のドメインの N 末端とが近くにあったため正しい解であると考え、以後の精密化を行った。

分子構造モデルの精密化を当初はプログラム X-PLOR (Brünger, 1992) で行ったが、途中からプログラム CNS (Brünger et al., 1998) を使用して行った。まず、得られた解に対して剛体近似精密化をおこなった。個々の原子の精密化を SA 法と CGLS 法の組み合わせによって行った。最初は、 $40\text{--}3.0 \text{ \AA}$ 分解能の反射を用いて精密化を行い、徐々に分解能の上限値を 1.5 \AA まで上げていった。それぞれの精密化サイクルには、個々の原子の位置及び等方的温度因子の精密化、 $2F_o - F_c$ マップや $F_o - F_c$ マップを用いたモデルの修正、残余のピークに対する溶媒分子の導入が含まれた。また、精密化の過程で、一つの高い電子密度ピークを水分子として精密化を進めていたが、途中でその温度因子と残余ピークから結晶化溶液中に含まれるカルシウムイオンであると判断し、それに変更して精密化した。モデルビルディングには、プログラム XtalView

(McRee, 1992) の Xfit を用いた。また、精密化の進行状況をモニターするために、ランダムに選んだ全体の 10% の反射をテストセットとして精密化に用いなかった。最終的に、1.5 Å までの全ての反射に対する R 値は 17.6% となった。精密化の統計値を表 3.3 に示す。得られた PL-D2 の原子座標は米国ラトガース大学の RSCB PDB に登録した (PDB code 1UHA)。

3. PL-D2 糖鎖複合体

3.1. 結晶化

tri-*N*-acetylchitotriose を PL-D2 に完全に結合させるため、前述の方法で調製した PL-D2 結晶化用試料にモル比で 10 倍量の tri-*N*-acetylchitotriose を加え、25°C で 1 時間インキュベートした。この試料を用いて結晶化をハンギングドロップ蒸気拡散法により行った。tri-*N*-acetylchitotriose を含むタンパク質溶液 1 μ l と各種沈殿剤溶液 1 μ l をシリコン処理したカバーガラス上で混合し沈殿剤溶液 500 μ l を入れたリザーバーの上にカバーガラスをかぶせて密封した。これを 25 °C の恒温槽中に静置して結晶化を行ったが、結晶を得ることはできなかった。そこで、糖鎖は構造的に自由度が高いことから、結晶化溶液中の過剰量の tri-*N*-acetylchitotriose の存在が PL-D2 複体の結晶生成を妨げていると考えタンパク質溶液中に加える tri-*N*-acetylchitotriose の量を変えて再び結晶化を行った。その結果、3 倍量の tri-*N*-acetylchitotriose を加えたタンパク質溶液とし、20 % PEG8000 と 0.2 M 酢酸マグネシウムを含む 0.1 M カコジル酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.5) を沈殿剤溶液として用いて上記の手順に従って結晶化を行った時に微結晶を得ることができた。しかしながら、ここで得られた微結晶は回折実験に適した大きさには成長せず、更なる結晶化条件の改善が必要とされた。そこで、回折実験に適した大きさの単結晶を得るために、この微結晶を種にしてマイクロシーディング法を繰り返すことにより図 3.3 に示す様な回折実験に適した大きさ

の結晶を得ることができた。

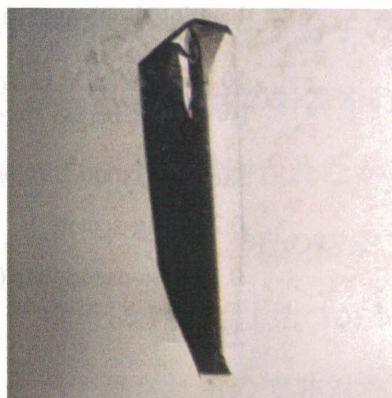


図3.3 PL-D2糖鎖複合体結晶の顕微鏡写真
結晶はおよそ $0.2 \times 0.4 \times 1.2$ mmの大きさ
まで成長した。

3.2. 結晶学的パラメータの決定

高エネルギー加速器研究機構物質構造科学研究所 放射光研究施設の BL18B において、波長 1.000 \AA の X 線を用いて放射光実験を行った。また回折強度は 2×2 アレイ型 CCD 検出器 (ADSC 社製 Quantum4) を用いて測定した。

本結晶は、 1.8 \AA 分解能まで回折点を与え、プログラム DPS/MOSFLM (Leslie, 1992; Evans, 1993) を用いた auto-ndexing の結果、単斜晶系に属し、空間群は $C2$ 、格子定数は $a=98.6 \text{ \AA}$ 、 $b=26.3 \text{ \AA}$ 、 $c=65.2 \text{ \AA}$ 、 $\beta=109.9^\circ$ と決定した。本結晶の非対称単位に PL-D2 が 2 分子存在していると仮定すると、 V_M 値は $2.17 \text{ \AA}^3 \text{ Da}^{-1}$ 、溶媒含量は 43% となりタンパク質結晶として妥当な値を与える。よって Z は 4 であると決定した。PL-D2 糖鎖複合体結晶の結晶学的パラメータを表 3.5 にまとめる。

表3.5 PL-D2糖鎖複合体結晶の結晶化条件および結晶学的データ

<i>Crystallization Conditions</i>	
Method	hanging drop vapor diffusion
Protein solution	10 mg/ml PL-D2 in Tris-HCl buffer (pH 7.5) (モル比で3倍量のtri-N-acetylchitotrioseを含む)
Precipitant	20% PEG8000 0.2 M Mg-acetate 0.1 M Na-cacodylate (pH 6.5)
Temperature	25 °C
<i>Crystallographic Data</i>	
Space group	C2
Lattice parameters	$a = 98.6 \text{ \AA}$, $b = 26.3 \text{ \AA}$, $c = 65.2 \text{ \AA}$ $\gamma = 109.9^\circ$
Z	4 (非対称単位にPL-D2-糖鎖2:2複合体が一つ)
V_M	$2.17 \text{ \AA}^3 \text{Da}^{-1}$
Solvent contents	43%

3.3. 回折強度測定

結晶から CCD までの距離を 150 mm、1 フレームあたりの露光時間を 60 秒、振動角 1.5° に設定して、 1.8 \AA 分解能までのデータ測定を行った。計 122 フレーム処理した結果、全体で 54,643 反射を観測することができた。個々のフレーム間におけるスケール因子を計算し等価な反射をマージした結果、14,699 個の独立反射を得ることができた。データの完全性は 98.4 %、 R_{merge} は 6.3 % であった。PL-D2 糖鎖複体のデータ収集と処理の統計値を表 3.2 に示す。

3.4. 構造解析および精密化

PL-D2 糖鎖複合体の構造解析は、プログラム MOLREP (Vagin & Teplyakov, 1997) を用いた分子置換法により行った。初期モデルとして 1.5 Å 分解能で決定した糖鎖非結合型 PL-D2 の分子構造を用いた。本結晶の非対称単位中に、PL-D2 が 2 分子含まれることが V_M 値から予測されるので、それら 2 分子の相対位置関係を知るためにクロス回転関数の計算に先立ち、自己回転関数の計算を行った。この際、10.0_4.0 Å 分解能の反射を用いたが、有意なピークは観測されなかった。クロス回転関数の計算を、10.0_3.0 Å 分解能の反射に対して行った。その結果、 7.8σ の有意なピークが ($\theta = 21.84$, $\phi = -71.39$, $\chi = 106.95$) の位置に 1 つだけ見つかった。本結晶の非対称単位には V_M 値から 2 分子含まれることが予測されるので非対称単位内の 2 分子が異なる配向をしているのならば、有意なピークは 2 つ観測されなければならない。そこで、非対称単位内に存在する 2 つの PL-D2 分子が同じ配向をしていて格子中での位置だけが異なると仮定し、2 つの分子の単位胞内での正確な位置を求めるため、ここで得られた回転関数の一つの解に対して並進関数を計算した。並進関数において、y 座標はこの空間群の場合本質的に決定出来ないので任意 (通常 0) でよい。xz 平面上でサーチした結果、やはりここでも有意なピークを与える解を ($x = 0.859$, $z = 0.035$) の位置に 1 つしか得ることができなかった。そこで、並進関数の解を注意深く調査した結果、上記で得られた並進関数の解に対して c 軸方向に 0.5 進んだところ ($x = 0.859$, $z = 0.535$) に低いピークが観測された。このピークの R 値は 65.2 % と受け入れがたい値ではあるが、正しい解だと仮定するならば、非対称単位内に存在する 2 つの分子は c 軸に平行な非結晶学的並進操作により関係付けられていることになる。そうであれば、これまでに得られた実験結果の説明がつく。自己回転関数は非対称単位内の回転対称の存在のみを示し、並進対称の情報については何も得ることができないので、非対称単位内に存在する 2 分子がほぼ同じ配向をしているのならば、自己回転関数において有意なピークは観測されず、またクロス回転関数においても有意なピーク

が一つしか得られないのも当然である。そこでこの解の妥当性を確かめるべく、ネイティブパターン関数を計算した。その結果、($u=0, v=0, w=0.5$) の位置に原点ピークの 74 %の高さを有するピークを確認でき、本結晶において、 c 軸に平行な非結晶学的並進対称が存在することが明らかとなった(図 3.4)。よって、これらの解が正しい解であると判断した。

精密化にはプログラム CNS (Brünger et al., 1998) を用いた。分子置換法によって得られた分子モデルは、24.2–3.0 Å 分解能の反射を用いて 20 サイクルの剛体近似精密化をすると $R=33.9\%$ となった。なお、これまでの PLs 分子の構造解析から、個々のドメイン間を連結するリンカーの柔軟性により、ドメイン間の配向には自由度があることが明らかとなっている (後述)。そのため、2 つのドメインを 1 つの剛体ではなく、各々を 1 つの剛体とみなして精密化を行った。個々の原子の精密化を CNS (Brünger et al., 1998) による SA 法と CGLS 法の組み合わせによって行った。最初は、24.2–3.0 Å 分解能の反射のみ用いて精密化を行い、徐々に上限の値を 1.8 Å 分解能まで上げていった。それぞれの精密化サイクルには、個々の原子の位置及び等方的温度因子の精密化、 $2F_o-F_c$ マップや F_o-F_c マップを用いたモデルの見直し、残余のピークに対する溶媒分子の導入を含めた。精密化の過程で、非対称単位中の 2 分子の PL-D2 の糖鎖結合部位の予測された位置に、糖残基 3 つ分の大きさの電子密度の固まりが 2 つ観察されたので、これを tri-*N*-acetylchitotriose として以降の精密化の計算に含めた。なお、プログラム CNS (Brünger et al., 1998) を用いた精密化において、タンパク質及び核酸以外のモデルを導入した場合、その分子 (ここでは、tri-*N*-acetylchitotriose) のジオメトリーに関する制約を課すために、トポロジーおよびパラメータファイル (結合角や結合長等が記述されたファイル) を作成する必要がある。Headley 等により Human lysozyme mutant との複合体として 1.8 Å で決定された tri-*N*-acetylchitotriose の結晶構造 (Headley et al., 1998) を参照してそれらを作成した。モデルビルディングをプログラムパッケージ XtalView (McRee, 1992) 中の Xfit を用

いて行った。また、精密化の進行状況をモニターするために、ランダムに選んだ全体の 10% の反射をテストセットとして精密化に用いなかった。最終的に、1.8 Å 分解能までの全ての反射に対する R 値は 19.5 % となった。精密化の統計値を表 3.3 に示す。得られた PL-D2 糖鎖複合体の原子座標は米国ラトガース大学の RCSB PDB に登録した (PDB code 1ULM)。

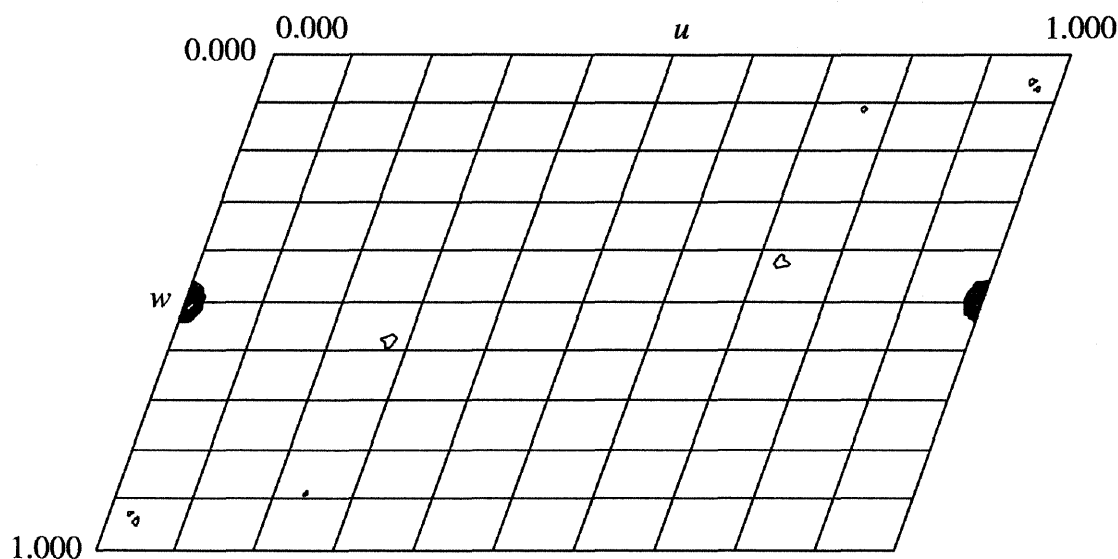


図 3.4 PL-D2 糖鎖複合体結晶のネイティブパターン図 ($v=0$)
10-5 Å 分解能の反射を用いて計算した。この図ではパターン関数の原点ピークを計算にいれなかった。

【考察】

1. 電子密度図の質および分子構造モデルの信頼性

1.1. PL-D1

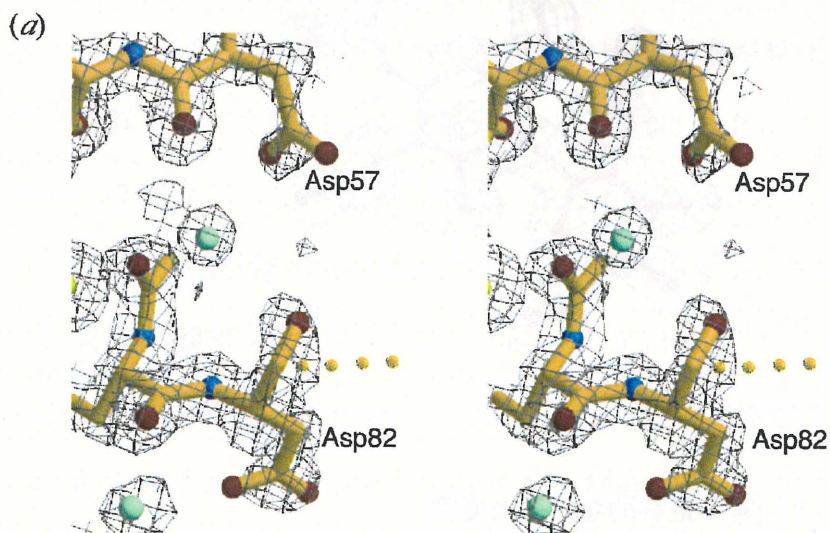
PL-D1 の結晶構造に対する最終的な $2F_o - F_c$ マップは、比較的良質なものであるが、残念ながら C 末端 2 残基 (Leu, Thr) に対する電子密度を見出すことはできなかった(後述)(図 3.5a)。そのため最終モデルには、C 末端 2 残基を含めなかった。Luzzati プロット (Luzzati, 1952) によって、モデル中の原子位置の誤差はおよそ 0.16 \AA であると見積もられた。モデルの理想値からのずれを示す r.m.s.d 値は、結合長において 0.004 \AA 、結合角において 1.3° 、improper 角において 0.60° であった。平均の温度因子は、622 個のタンパク質原子において 12.1 \AA^2 、主鎖のみに限れば 10.3 \AA^2 であり、129 個の水分子においては 24.7 \AA^2 となっている。

1.2. 糖鎖非結合型 PL-D2

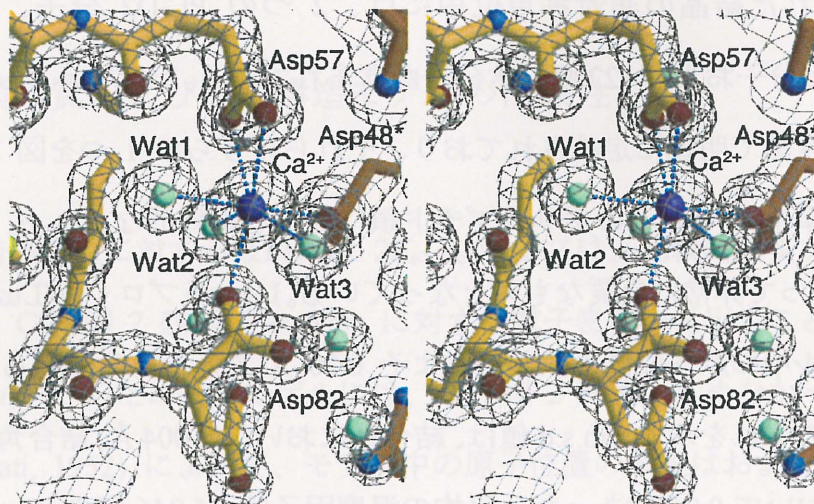
糖鎖非結合型 PL-D2 の結晶構造に対する最終的な $2F_o - F_c$ マップは、全体に渡って非常に良質なものであった。多くの芳香族環内や、プロリン残基の五員環内には穴が空いているように見える (図 3.5b)。最終モデルには全てのタンパク質原子が含まれている。また、Luzzati プロット (Luzzati, 1952) によって、モデル中の原子位置の誤差はおよそ 0.24 \AA であると見積もられた。モデルの理想値からのずれを示す r.m.s.d 値は、結合長において 0.004 \AA 、結合角において 1.2° 、improper 角において 0.62° であった。平均の温度因子は、623 個のタンパク質原子において 17.1 \AA^2 、主鎖のみに限れば 15.0 \AA^2 、81 個の水分子においては 29.1 \AA^2 となっている。また、カルシウムイオンの温度因子は 12.4 \AA^2 と妥当な値になっている。

1.3. PL-D2 糖鎖複合体

今回得られた結晶の非対称単位中には、2 つの PL-D2 分子、2 つの tri-*N*-acetylchitotriose 分子および 122 個の水分子が含まれている。2 つの tri-*N*-acetylchitotriose 分子は電子密度図で明瞭に定義されており、それらのうちの 1 つを図 3.5c に示す。また、非対称単位中の 2 つのポリペプチド鎖に対する最終的な $2F_o - F_c$ マップに関しても、全体に渡って非常に良質なものとなっている。Luzzati プロット (Luzzati, 1952) によって、モデル中の原子位置の誤差はおよそ 0.20 Å であると見積もられた。モデルの理想値からのずれを示す r.m.s.d 値は、結合長において 0.004 Å、結合角において 1.3°、improper 角において 0.76°であった。平均の温度因子は、1,246 個のタンパク質原子において 28.0 Å²、主鎖のみに限れば 24.1 Å²、122 個の水分子においては 37.1 Å² となっている。また、tri-*N*-acetylchitotriose の平均の温度因子は 31.9 Å² である。



(b)



(c)



図 3.5 PL-Ds の最終的な電子密度図

(a)および(b)は、それぞれ PL-D1 および PL-D2 の C 末端近傍の $2F_o - F_c$ マップのステレオ図を示す。図(b)のカルシウムイオンを紫色の球で示す。また結晶学的に等価な隣接分子はオレンジ色で塗り分けられている。(c) PL-D2 糖鎖複合体モデルから糖鎖を削除して計算された $F_o - F_c$ オミットマップ。

2. 全体構造および結晶パッキング

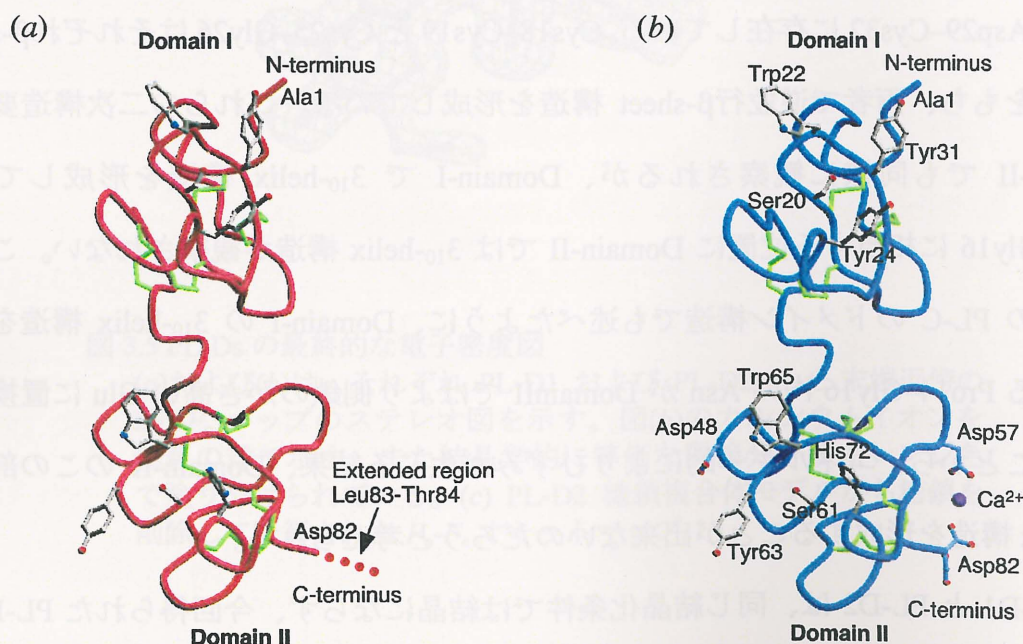
2.1. PL-D1 および糖鎖非結合型 PL-D2

最終的に得られたモデルは、PL-D1 に関しては C 末端 2 残基を除く 82 アミノ酸残基と 132 個の水分子を含んでいる。PL-D1 の C 末端 2 残基 (Leu83–Thr84) に対する電子密度は得られず、最終的なモデルには含めていない。PL-D2 の分子モデルは、ポリペプチド鎖内の 82 個の全てのアミノ酸残基と 81 個の水分子および 1 個のカルシウムイオンを含んでいる。このカルシウムイオンは PL-D2 分子の C 末端に結合している (図 3.5b)。

PL-D1 と PL-D2 は、共に 2 つのキチン結合ドメインから構成されている (図 3.6)。前章でも述べたように、約 40 程度のアミノ酸残基からなる各々のキチン結合ドメインは特徴的な二次構造要素を持たないが、保存された 4 つのジスルフィド結合により、その三次元構造は維持されている。しかしながら、プログラム PROCHECK⁸⁷⁾を用いた同定により、PL-C のキチン結合ドメインにおいて観察された二次構造要素の位置と相当する位置に同じような幾つかの短い二次構造要素が見出された。両者の Domain-I に関して詳しく言えば、 3_{10} -helix 構造が Glu6–Ala8 と Pro14–Gly16 に、 α -helix 構造が Asp29–Cys32 に存在している。Cys18–Cys19 と Cys25–Gly26 はそれぞれ β -strand の特徴をもち、両者で逆並行 β -sheet 構造を形成している。これらの二次構造要素は Domain-II でも同様に観察されるが、Domain-I で 3_{10} -helix 構造を形成している Pro14–Gly16 に相当する位置に Domain-II では 3_{10} -helix 構造が観察されない。これは第一章の PL-C のドメイン構造でも述べたように、Domain-I の 3_{10} -helix 構造を形成している Pro14–Gly16 内の Asn が DomainII ではより側鎖のかさ高い Glu に置換されていることから、エネルギー的によりひずみが生じる結果、Domain-II のこの部位は 3_{10} -helix 構造を形成することが出来ないのだろうと考えられる。

PL-D1 と PL-D2 は、同じ結晶化条件では結晶にならず、今回得られた PL-D1 結

晶と PL-D2 結晶は異なる結晶系に属している。両者の C 末端近傍の電子密度図を図 3.5 に示す。この図が示すように、PL-D2 結晶中での分子のパッキングは、C 末端 Asp82 に結合したカルシウムイオンを介した結晶学的に等価な隣接分子との相互作用により形成されている。C 末端側に二残基付加された PL-D1 で PL-D2 の結晶パッキングの形成を考えた時、付加された C 末端二残基により隣接分子との間で立体障害を生じてしまうため、そのようなパッキングは形成できないだろうと推察される。そのため、PL-D1 は PL-D2 と同じ結晶系にならなかったであろう。一方、PL-D1 結晶において、その C 末端近傍は今回電子密度中に見出されなかった二残基 (Leu83-Thr84) を収容し得るに十分な空間が隣接分子との間に存在する。もし、この空間が二残基をぴったりと収める大きさであるならば、隣接分子との相互作用の結果、はっきりとした電子密度が得られたかもしれない。事実、PL-D1 の C 末端二残基に対する電子密度が得られなかったのは、それが持つ本質的な構造上の柔軟性に加え、自由な動きを許す結晶学的環境の存在にもよるものと考えられる。PL-D1 と PL-D2 の異なる結晶化条件および異なる結晶系は、両者の C 末端における違いを反映しているのだろう。



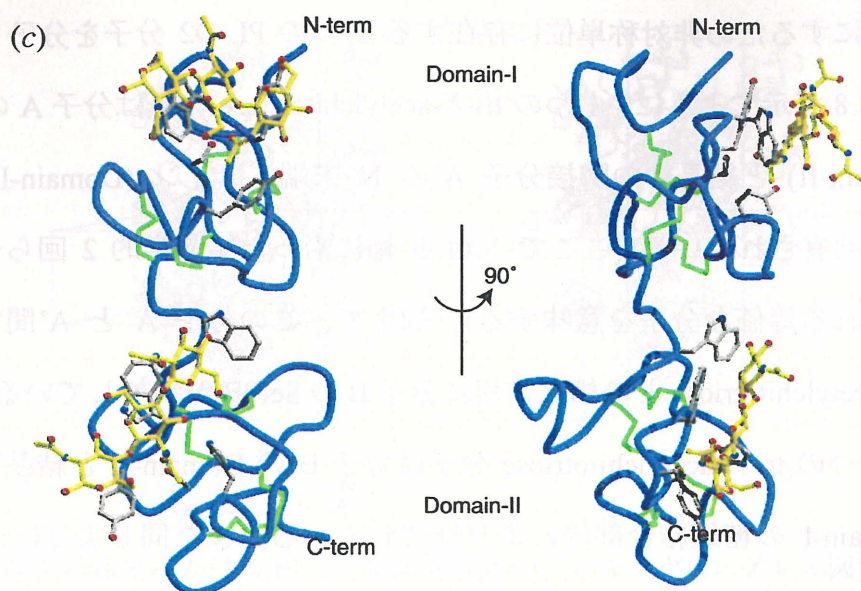


図 3.6 PL-Ds の全体構造

(a) PL-D1 (b) PL-D2 (c) PL-D2 糖鎖複合体。(c) の左図は、糖鎖結合部位に対して真正面から見たもので、右図は図中の垂線に対して矢印方向に左図を 90° 回転させて描いた図である。糖鎖結合残基 (灰色) および PL-D2 糖鎖複合体中の糖鎖 (黄色) を ball-and-stick モデルで表示している。ジスルフィド結合を緑で示す。

2.2. PL-D2 糖鎖複合体

今回得られた PL-D2 糖鎖複合体結晶の非対称単位中には、2 つの PL-D2 分子、2 つの tri-*N*-acetylchitotriose 分子および 122 個の水分子が含まれている。PL-D2 糖鎖複合体の全体構造を図 3.6c に示す。ネイティブパターン図から予測されたように (実験の部参照)、2 つの PL-D2 糖鎖複合体は結晶学的 *c* 軸に沿った非結晶学的並進対称により関係付けられている (図 3.7)。しかしながら、非対称単位中の 2 つの PL-D2 分子は、それら分子内ドメイン間の配向の違いにより結晶学的 *c* 軸に対して厳密に同じ配向で存在しておらず (後述)、そのためこの非結晶学的並進操作は結晶学的 *c* 軸に対して完全に平行ではない。

記述を簡便にするため非対称単位に存在する 2 つの PL-D2 分子を分子 A、分子 B とする。図 3.8 が示すように、1 つの *tri-N-acetylchitotriose* 分子は分子 A の C 末端ドメイン (Domain-II) と結晶中の隣接分子 A' の N 末端ドメイン (Domain-I) の糖鎖結合部位により共有されている (ここで ' は *b* 軸に沿った結晶学的 2 回らせん軸によって関連付けられる等価な分子を意味する)。加えて、この分子 A と A' 間で形成されている *tri-N-acetylchitotriose* との相互作用に分子 B の Ser9B が参加している (図 3.8)。同様に、もう 1 つの *tri-N-acetylchitotriose* 分子は分子 B の Domain-II と結晶中の隣接分子 B' の Domain-I の糖鎖結合部位により挟まれている。また同じように、分子 B と B' 間で形成されている *tri-N-acetylchitotriose* との相互作用に分子 A の Ser9A が参加している (後述)。従って、PL-D2 一分子あたり一つの *tri-N-acetylchitotriose* 分子が結合し、非対称単位内で PL-D2 : *tri-N-acetylchitotriose* = 2 : 2 複合体を形成している。上述の *tri-N-acetylchitotriose* を介した分子間相互作用に加えて 2 つの水素結合 (Glu39A-Asp70B, Gln37A-Asp70B) が非対称単位内の 2 つの PL-D2 分子間に形成されており、これら一連の相互作用により結晶パッキングが安定化され、複合体によるらせん状の分子鎖を形成している (図 3.7)。

糖鎖結合型および糖鎖非結合型 PL-D2 分子間では、それらの分子内ドメイン間の配向における違い (後述) を除き、各々のドメインの構造上の違いは観測されない。また、糖鎖結合型および糖鎖非結合型 PL-D2 分子間で、糖鎖結合部位のジオメトリーは、特に同一である。このことは、糖鎖の結合はそれぞれのドメイン中の糖鎖結合部位のジオメトリーに影響を及ぼさないということを示している。しかしながら、分子 A および B の Ser9 の ϕ および ψ 角は、糖鎖との相互作用の結果、糖鎖非結合型 PL-D2 に比べて大きく異なっている。

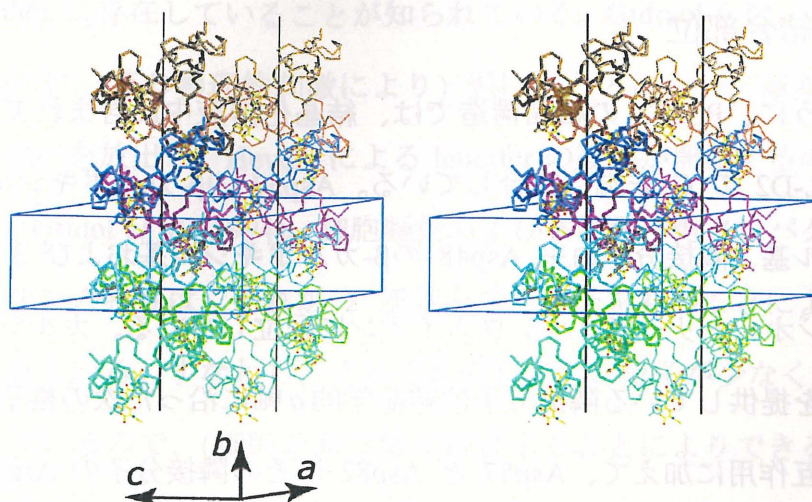
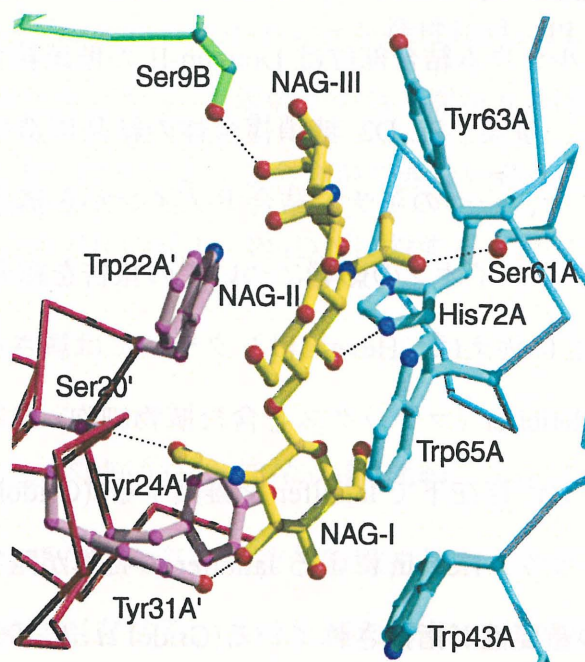


図 3.7 結晶中における PL-D2 糖鎖複合体のパッキング (ステレオ図)

非対称単位中の非結晶学的並進対称操作により関係付けられた 2 分子を太い線および細い線を用いて同じ色付けで表示している。結晶学的 2 回らせん軸 (垂線) により関係付けられた糖鎖を共有している隣接分子を異なる色で表している。tri-*N*-acetylchitotriose (黄色) および糖鎖結合残基を ball-and-stick モデルで表示している。図中の矢印は結晶軸の方向を、垂直な 2 本の線は結晶学的 2 回らせん軸を示している。


 図 3.8 PL-D2 と tri-*N*-acetylchitotriose の結合様式

tri-*N*-acetylchitotriose (黄色) は隣接分子間に挟まれている。ピンクで色付けられた分子 A' は、青で色付けられた分子 A と結晶学的 2 回らせん軸によって関係付けられている。非対称単位中で分子 A と非結晶学的並進操作によって関係付けられた分子 B (緑色) が、この相互作用に参加している。水素結合を点線で表す。

3. カルシウム結合部位

前述したように、PL-D2 の結晶構造では、結晶化溶液中に含まれていたカルシウムイオンが PL-D2 の C 末端に結合している。Asp57 の β -カルボキシル基、Asp82 の α -カルボキシル基、隣接分子由来 Asp48 の β -カルボキシル基および 3 つの水分子が octahedral のジオメトリでカルシウムイオンに配位している。カルシウムの配位子として Asp48 を提供している隣接分子は結晶学的 a 軸に沿った次の格子に属する。またこれらの相互作用に加えて、Asp57 と Asp82 はその隣接分子の Arg44 と Arg47 とそれぞれ塩橋を形成している。これら一連の相互作用は結晶形成に必要であるのは明らかであるが、生理学的にどのような役割を持つかわからない。

肝レクチン、マクロファージレクチン、血清レクチン、コングルチニン等の C-型レクチンは、その活性発現にカルシウムを必要とする (Sharon & Lis, 1990; Halina & Sharon, 1998)。PL-D2 に関して、カルシウムイオンは糖鎖の結合に必須ではないと考えられる。なぜなら、カルシウム結合部位は Domain-II の糖鎖結合部位に対して分子の反対側に位置しており、事実、PL-D2 糖鎖複合体の結晶構造にカルシウムイオンは存在していない。ここで、一つのキチン結合ドメインから構成されるゴムの木由来 Hevein に対するカルシウムイオンの影響についての報告を紹介する。Goldstein の定義 (Liener *et al.*, 1986) に従えば、Hevein はレクチンには属さない。しかし、通常条件下では、Hevein は laticifer (ラテックスを含む植物細胞) を凝集することはできないが、酸性条件および Ca^{2+} 存在下で laticifer を凝集する (Gridol *et al.*, 1994)。EDTA 等のキレート剤の添加により、Hevein による laticifer の凝集が阻害されることから、細胞凝集における Ca^{2+} の重要性が指摘されている (Gridol *et al.*, 1994)。しかし、 $^1\text{H-NMR}$ を用いた溶液実験から、 Ca^{2+} 非存在下でも Hevein は糖鎖に結合することが示され、糖鎖の結合に Ca^{2+} は必要ではないと考えられている (Asensio *et al.*, 1995)。Hevein は laticifer の lutoid と呼ばれる液胞に多量に存在しており、その液胞の pH は 5.5 で Ca^{2+}

が豊富 (1.5 mM) に存在していることが知られている。Gidraol らは、この液胞が (単純に樹脂を傷つける等の物理的刺激により) 裂けることによって凝集が起こる近傍の pH を下げ Ca^{2+} を放出し、Hevein による laticifer の凝集が開始するのではないかと推測している (Gridol *et al.*, 1994)。細胞凝集および多糖類や糖タンパク質を沈降させるというレクチンの特性は、それが 2 価以上の結合価をもつことによって生じるからだと考えられている。すなわち、それぞれのレクチン分子が少なくとも 2 つの結合部位をもっているので、(細胞表面の糖と結合することによりできる) 細胞間の架橋や糖を含む巨大分子間の架橋を容易に作ることができるからである。それ故、一つの結合部位しかもたない Hevein による細胞間の架橋は考えにくいことから、酸性条件および Ca^{2+} は糖鎖との結合に必要なのではなく、Hevein を多量体化させるのに必要なのではないかと推察されている (Gridol *et al.*, 1994)。PL-D2 に関しても同様に、糖鎖の結合にカルシウムが必須であるとは考えられないが、マイトジェン活性に関与するのかもしれない。つまり、マイトジェン活性には、PL-D2 結晶構造で観察されたようなカルシウムを介した C 末端側での分子間相互作用が必要であり、C 末端に 2 残基伸張した PL-D1 はそのような会合ができない結果、マイトジェン活性を失ったのかもしれない。いずれにせよ、PL-D2 に対する Ca^{2+} の影響については今後の研究の課題である。

4. ドメイン構造および糖鎖結合部位の剛体性

一つのドメインは明らかな二次構造的特徴を持たないが、各々のドメインには四つのジスルフィド結合が存在し、それらがこのドメイン構造を維持している。第一章でも述べたように、特徴的な二次構造要素をもたないこのドメイン構造は、これらのジスルフィド結合に加えて数多く存在するドメイン内水素結合により強固に維持されている。これまでに、X 線結晶構造解析の手法を用いてその構造が決定さ

れたキチン結合関連タンパク質と PLs 分子のキチン結合ドメインの重ね合わせ図を図 3.9 に示す。UDA-VI を除くこれら分子の個々のドメイン全ての可能な組み合わせの重ね合わせを行った結果、C α 原子位置の r.m.s.d 値は 0.30 Å から 0.71 Å の範囲に収まり、全ての分子間でドメインの構造は強く保存されていることがわかった。これらタンパク質の各々のドメインの立体構造は互いによく似ているが、UDA-VI に関していくつかのループに局所的な構造上の違いが観測された。最も大きな構造上の違いが観測された領域は、UDA-VI の Cys3–Cys12 および Cys77–Cys82 間に相当するループである。前者のループは全体的に Gly に富んだ領域であり、後者のループには一残基のアミノ酸の挿入がある。一方、構造変化がほとんど見られない領域は、ドメインの中心に位置し、糖鎖結合に関与する保存された 3 つの芳香族残基を含むループである。このループは比較的短く、その両末端はジスルフィド結合によりしっかりと固定されている。PL-D2 に関して詳しく言えば、このループの N 末端側は一つのジスルフィド結合 (Cys13–Cys25) で、C 末端側は 2 つの連続したジスルフィド結合 (Cys4–Cys19 および Cys18–Cys32) によって固定されている。このようにドメインに存在する 4 つのジスルフィド結合のうち 3 つがこのループの安定化に寄与している。更に、それら 3 つの糖鎖結合残基の芳香族環が形成する糖鎖結合ジオメトリーは、糖鎖との結合・非結合に関わらず非常によく一致している。図 3 に示すように、キチン結合ドメインの 1 次構造は全体としてグリシンに富んでいるにも関わらず、その三次元構造において、糖鎖と相互作用する芳香族残基の周りには、かさ高い側鎖の残基が集中している。PL-D2 に関して詳しく言えば、Trp22、Tyr24、Tyr63、Trp65 の側鎖は各々 Gln21、Pro2、Lys62、Arg44 の側鎖と π - π および CH- π 電子相互作用によりその環の配向は維持され、側鎖の層構造を形成している。PL-D2 のこれら Gln21、Pro2、Lys62、Arg44 残基に相当する位置には、キチン結合ドメインを持つ他のタンパク質においても、疎水性あるいはかさ高い側鎖をもつ残基が強く保存されている (図 1.2)。その結果、糖鎖結合部位における芳香族トライアドのジオメトリー

はこれらのかさ高い側鎖をもつ残基により厳密に制限されている。これらのかさ高い側鎖を持つ残基は、糖鎖と特異的な相互作用を効率的に行えるような糖鎖結合部位のジオメトリーを保つために、進化の過程で優先的に保存されてきたのであろうと考えられる。

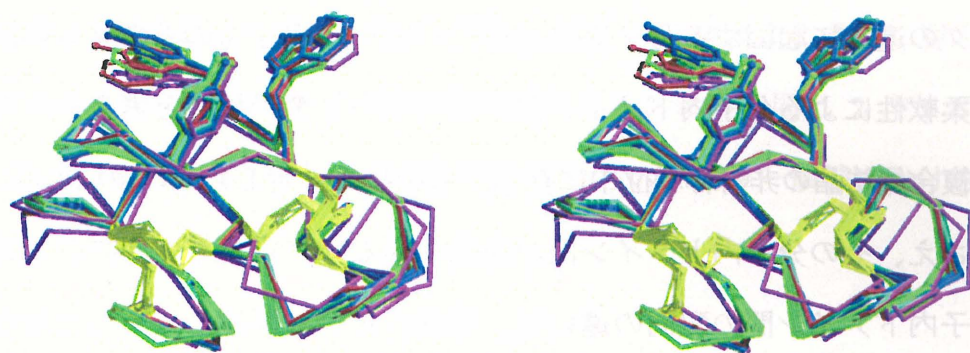


図 3.9 キチン結合ドメインの構造比較

PL-C, PL-D2, PL-D2 糖鎖複合体, UDA-VI (PDB code 1EHH)および WGA1 (PDB code 2CWG)のキチン結合ドメインを、それぞれ青、シアン、赤、紫および緑色で塗り分けしている。それぞれのタンパク質中の全てのドメインは同じ色で表されている。ジスルフィド結合を黄色で色分けし、糖鎖結合残基を ball-and-stick モデルで表示している。

5. 分子内ドメイン間の柔軟性

PL-D2 複合体の非対称単位内に存在する 2 つの分子間における $C\alpha$ 原子位置の r.m.s.d 値は 0.79 \AA であり、糖鎖非結合型 PL-D2 に対する 2 つの糖鎖結合型 PL-D2 分子のその値はそれぞれ 0.58 \AA と 1.10 \AA と大きく異なっている。第一章で述べたように PL-C の 2 つのサブユニット間の $C\alpha$ 原子位置の r.m.s.d 値は 1.25 \AA である。サブユニットあるいは分子間のドメイン同士の全ての可能な組み合わせによる重ね合わせ

の結果、C α 原子位置の r.m.s.d 値は平均で、PL-C では 0.44 Å、PL-D2 では 0.36 Å であり、サブユニットあるいは分子間の対応するドメインの C α 原子位置の r.m.s.d 値は平均で 0.35 Å と小さな値である。すなわち、個々のドメインの立体構造は強く保存されているのにも関わらず、個々のドメイン間の配向は同じ種類のサブユニット間あるいは分子間においてさえ大きく異なり、サブユニットあるいは分子の全体構造がそれらの間で異なっていることがわかる(図 3.10)。ドメイン間の配向の違いは PL-D1 と PL-D2 分子間でも同様に観察されており(後述)、これらの違いは結晶中でのパッキングの違いに起因する分子間相互作用の違いによるものと考えられるが、リンカーの柔軟性による分子内ドメイン間の配向の自由度の現れと考えられる。また、PL-D2 複合体結晶の非対称単位中に存在する糖鎖に結合した 2 つの PL-D2 分子間においてさえ、その分子内ドメイン間の配向は異なっていることから、ここで観察された分子内ドメイン間の配向の違いは、糖鎖の結合に関連したものではなく、隣接ドメイン間を連結するリンカーの本質的な柔軟性の度合いを反映しているものと考えられる。それ故、このリンカーは、細胞表面上のターゲット分子への結合の際、個々のドメインが適切な配向をとれるようにこれらの分子に柔軟性を賦与する役割を果たしているのだろう。

図 3.10 に 2 つのキチン結合ドメインからなる UDA-IV と PL-D2 の重ね合わせ図を示す。この図からも明らかなように、各々の分子における 2 つのドメイン間の配向は大きく異なっている。両タンパク質ともこの種の他のレクチンと比較して、赤血球凝集活性は極めて低い (Galleli & Truffa-Bachi, 1993; Peumans *et al.*, 1994; Yamaguchi, 1997)。それらの赤血球凝集活性が極端に低いことに対する一つの理由として、両者とも 2 つのキチン結合ドメインから構成される最小のレクチンであるということがあげられる。しかし、両者間の赤血球凝集活性は大きく異なる。トリプシン処理をしたウサギ赤血球を凝集させるのに必要とされる PL-D2 のタンパク質濃度は、UDA のそれに対して 6 倍もの濃度が必要とされる (Galleli & Truffa-Bachi, 1993;

Peumans *et al.*, 1994; Yamaguchi, 1997)。2つの分子間で糖鎖結合に関与する芳香族環の種類は異なるが、上述したように、個々のドメインにおける糖鎖結合部位のジオメトリーはほとんど同じであり、また後で述べるが、それらの糖鎖結合様式も殆ど同じである。両者の間で異なる点は、UDA-VI のリンカーは PL-D2 より 5 残基程度長いことであり、そのことが両者の分子内ドメイン間の配向に決定的な違いを生じさせている。PL-D2 の 2 つの糖鎖結合部位は、分子の同じ側面に位置付けられており、UDA-VI のそれらは、分子の異なる側面に位置付けられている。細胞間を架橋するうえで、2つの細胞の表面上のターゲット分子の立体配置に柔軟に適応できる構造を有するほうがより凝集活性が高いと考えられる。よって同じ 2 ドメイン構造の UDA と PL-D2 の赤血球凝集活性の違いは、それらのリンカー領域における構造の柔軟性の違いに起因しているのかもしれない。

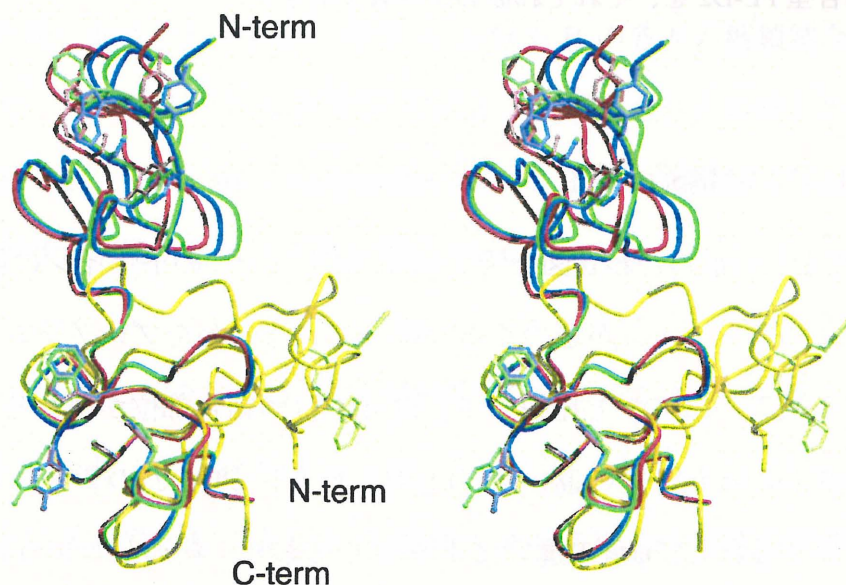


図 3.10 隣接ドメイン間を連結するリンカーの柔軟性 (ステレオ図)

この重ね合わせは、それぞれの分子の Domain-II の Ca 原子座標を用いて最小二乗法により行われた。糖鎖結合残基を ball-and-stick モデルで表す。PL-D2 糖鎖複合体結晶の非対称単位中の 2 分子を赤と青で示す。糖鎖非結合型 PL-D2 分子および UDA-VI (PDB code 1EHH) を、それぞれ緑および黄色で表す。

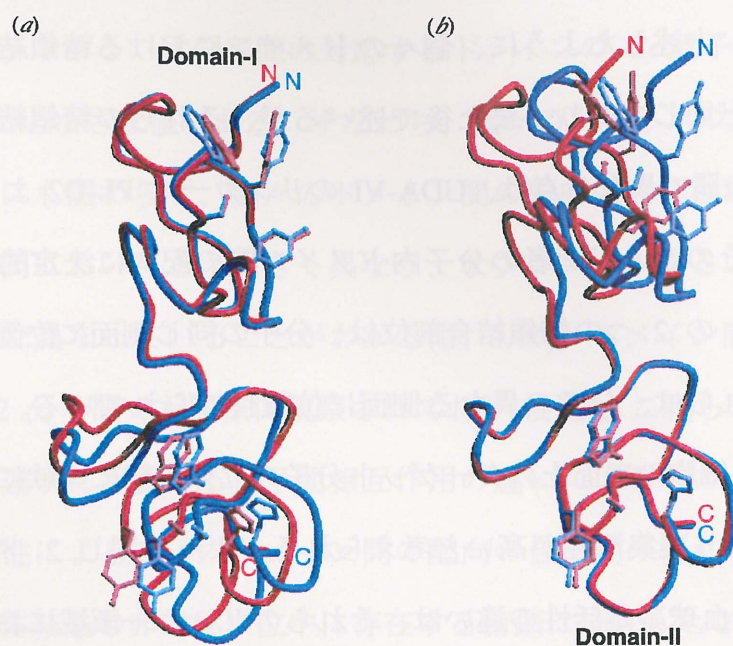


図 3.11 PL-D1 と PL-D2 の構造比較

(a) および (b)は、それぞれ Domain-I の C α 原子 および Domain-II の C α 原子の座標を最小二乗法により重ね合わせて描かれた図である。糖鎖結合残基を ball-and-stick モデルで表す。PL-D1 および糖鎖非結合型 PL-D2 を、それぞれ赤および青で表す。

6. PL-D1 と PL-D2 の構造比較

PL-D1 と PL-D2 の重ね合わせ図を図 3.11 に示す。一つのドメインの糖鎖結合部位に対してもう一つのドメインがどのくらい傾いているのかをプログラム DYMDON を用いて計算した結果、PL-D2 と比較して、PL-D1 は両結合部位が離れる方向へ 14° 傾いていることがわかった。その違いは、PL-D1 および PL-D2 の各リンカーペプチド (Asp41_Trp43) の ϕ および ψ 角の違いにより生じており、前述したように、これらドメイン間の相対的配向の違いはリンカーの柔軟性によるものと考えられる。一方、PL-D1 および PL-D2 の対応するドメインの C α 原子位置の r.m.s.d 値は、Domain-I および Domain-II に対してそれぞれ 0.28 \AA および 0.24 \AA であり、有意な構造上の違い

は観察されなかった。PL-D1 と PL-D2 の本質的な違いは、PL-D1 が C 末端に 2 残基 (Leu83_Thr84) 伸張していることだけである。今回得られた PL-D1 結晶構造において、その C 末端 2 残基はモデリングすることができなかった。それ故、PL-D1 のマイトジェン活性の欠如に対する C 末端領域が及ぼす影響については議論することができない。しかし、立体構造上、この C 末端 2 残基は糖鎖結合部位に対して分子の反対側に位置することが予測されるため、糖鎖の結合に直接関与するとは考えにくい。

7. 糖鎖-タンパク質間相互作用

前述したように、PL-D2 糖鎖複合体結晶の非対称単位中には、2 つの PL-D2 分子と 2 つの糖鎖が含まれている。一つの糖鎖は分子 A の Domain-II の糖鎖結合部位と分子 A' の Domain-I の糖鎖結合部位の間で共有されている。同じように、非対称単位中のもう一方の糖鎖は分子 B の Domain-II 糖鎖結合部位と分子 B' の Domain-I の糖鎖結合部位の間で共有されている。分子 A と分子 B の各々の糖鎖結合様式はほとんど同じなので、以下には分子 A と分子 A' によって形成される糖鎖との相互作用について詳細を述べる。また、tri-*N*-acetylchitotriose の 3 つの糖残基名に対する簡便な記述のため、非還元末端から還元末端へ順に NAG-I、NAG-II、および NAG-III と記述する。

Domain-II の糖鎖結合部位は 3 つの糖残基全てと相互作用を形成している。主に糖鎖と相互作用をしている残基は Ser61A、Tyr63A、Trp65A および His72A である。タンパク質と糖鎖の間に形成される 2 種類の非共有結合が糖鎖の認識と安定化に重要な役割を果たしている。各糖残基のピラノース環の配向は、ファン・デル・ワールス接触によって安定化されている。Trp65A のインドール環は NAG-I および NAG-II と疎水的相互作用を形成し、Tyr63A のフェノール環は NAG-III のピラノース環と

face-to-face 接触をしている。加えて、PL-D2 分子の 2 つのドメインを連結するリンカー部位にある Trp43 が、非還元末端側でこれらの疎水的相互作用に参加している。Domain-II の糖鎖結合部位に対する Trp43A の位置に注目することは非常に重要である。なぜなら、還元末端側への糖残基の付加はモデリング可能であるのに対し、非還元末端側へのモデリングは Trp43A と立体障害を生じるため不可能である。それ故、Domain-II の糖鎖結合部位は糖鎖の結合に対して立体的な制限を受けている。糖鎖特異性は、水素結合により決定されている。Ser61A と His72A は NAG-II の *N*-アセチル基のカルボニル酸素とそれに隣接した C'3 位の水酸基とそれぞれ水素結合を形成している。更に His72A のイミダゾール環は *N*-アセチル基のメチル基と CH- π 相互作用を形成している。PL-D2 の Domain-II の Ser61 に相当する残基はここで考慮されているタンパク質の全てのキチン結合ドメインにおいて完全に保存されており、Ser の水酸基と *N*-アセチル基のカルボニル酸素間の水素結合はこのファミリーにおける他の結晶構造でも同様に確認されている。PL-D2 の His72 の位置に相当する極性芳香族残基が強く保存されている。唯一、この極性芳香族残基は WGA1 の Domain-III において例外的に非極性芳香族残基 Phe に置換されているが、糖鎖の結合は可能であることがその結晶構造から示されている。influenza virus hemagglutinin や *Amaranthus caudatus* agglutinin 等の他の種のレクチンにおいて *N*-アセチル基中のメチル基と芳香族残基との間に形成される CH- π 相互作用が認識されている (Weis *et al.*, 1988; Transue *et al.*, 1997)。以上のことから、PL-D2 の Domain-II の 72 番目の位置に相当する保存された芳香族残基は、*N*-アセチル基に隣接した C'3 位の水酸基を認識するというより、むしろ CH- π 相互作用により *N*-アセチル基を認識するために必要なかもしれない。このように、Ser61A と His72A は *N*-アセチル基に対する特異性決定因子としての役割を果たしている。

Domain-I における糖鎖結合部位と糖鎖の相互作用は Domain-II におけるそれと

似ている。しかし、Domain-II の糖鎖結合部位が 3 つの糖残基全てと相互作用を形成しているのに対し、Domain-I の糖鎖結合部位は 2 つの糖残基としか相互作用を形成していない。Domain-I の糖鎖結合部位において糖鎖の結合に関与している残基は、Ser20A'、Trp22A'、Tyr24A' および Tyr31A' である。Ser20A' と Tyr31A' は、非還元末端の NAG-I の *N*-アセチル基のカルボニル酸素とそれに隣接した C'3 位の水酸基とそれぞれ水素結合を形成している。Trp22A' と Tyr24A' は NAG-II と NAG-I のピラノース環と各々 *face-to-face* 接触をしている。従って、Domain-I の糖鎖結合部位は非還元末端側の NAG-I と NAG-II の 2 つの糖残基としか相互作用をしておらず、還元末端側の NAG-III とは全く相互作用をしていない。糖鎖と結合部位の接触面積は Domain-I と Domain-II に対してそれぞれ 480 と 583 Å² であり、Domain-II の方が Domain-I と比べて、糖鎖とより広範囲に渡って接触していることがわかる。しかし、Domain-II と異なり、Domain-I の糖鎖結合部位は糖鎖の非還元あるいは還元末端のいずれにも糖鎖を伸張させることができる。PL-D2 の 2 つのドメインとそれらに結合した糖鎖を重ね合わせた図を図 3.12 に示す。この重ね合わせにおいて、Domain-II の糖鎖結合部位に結合した糖鎖と Domain-I の糖鎖結合部位の関係に着目したとき、Domain-I の糖鎖結合部位は還元末端側の NAG-II および NAG-III の 2 つの糖残基に特異的であり、非還元末端側の NAG-I は Domain-I の糖鎖結合部位と相互作用をしていない。この場合における糖鎖と結合部位の接触面積の値は 495 Å² であり、実際の結晶構造における値 480 Å² とほぼ等しい。このように、PL-D2 の Domain-I の糖鎖結合部位は、糖鎖の結合に対して立体的な制限が無いかわりに、糖残基に対して本質的に 2 つのサブサイトしかもたない。

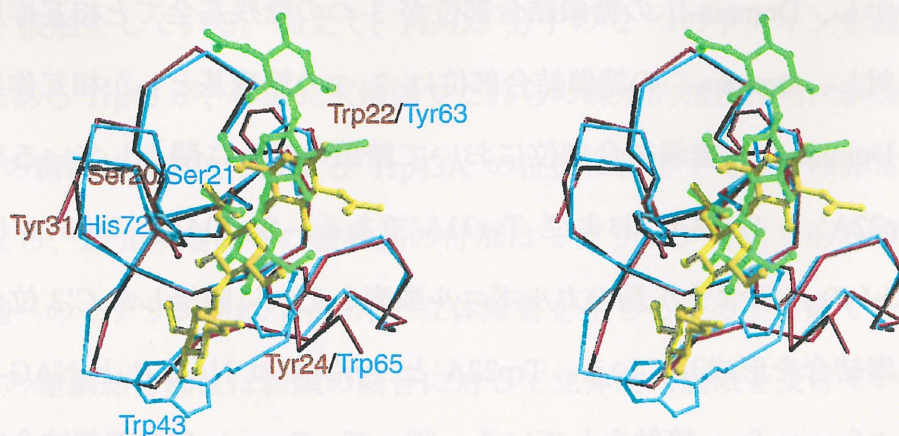


図 3.12 PL-D2 糖鎖複合体の 2 つのドメインにおける糖鎖結合様式の比較 (ステレオ図)

Domain-I (赤) に結合した糖鎖を緑色で、Domain-II (青) に結合した糖鎖を黄色で表す。

UDA に関して、溶液実験から 2 つの結合部位における糖鎖結合親和力の違いが報告されている (Shibuya *et al.*, 1986; Hom *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1998)。Harata らは、その結合親和力による違いは、糖鎖結合部位を構成するアミノ酸残基の違いによるものではないかと推察している (Harata *et al.*, 2000, 2001)。一方、Saul らは、その結合親和力における違いは、糖鎖結合部位の糖鎖に対する立体的に制限された特異性の違いによるものではないかと推察している (Saul *et al.*, 2000)。UDA 糖鎖複合体の結晶構造は PL-D2 糖鎖複合体のそれと非常によく似ている (Harata & Muraki, 2000; Saul *et al.*, 2000)。隣接分子間による糖鎖の共有も UDA 糖鎖複合体の結晶構造で観察されている。しかしながら、UDA の Domain-I と Domain-II の糖鎖結合様式は PL-D2 のそれらと反対の関係にある。つまり、3 つの糖残基と相互作用を形成している糖鎖結合部位は、PL-D2 では Domain-II であるが、UDA では Domain-I である。一方、非還元側の 2 つの糖残基とのみ相互作用を形成しているのは、PL-D2 では Domain-I であるが、UDA では Domain-II である。UDA に関して、Domain-I および Domain-II の間で糖鎖の結合に関与するアミノ酸残基の違いは、唯一、His67 による Trp21 の置換にある。PL-D2 に関して、糖鎖結合残基は、Domain-I では Ser20、Trp22、Tyr24

および Tyr31 であり、Domain-II では Ser61, Tyr63, Trp65 および His72 で各々のドメイン中の 3 つの芳香族残基の種類は互いに異なる。それらの中でも、Domain-II の糖鎖結合部位で糖鎖と強い相互作用を形成している Trp65 が Domain-I の相当する位置で Tyr24 に置換されていることは、2 つのドメイン間の糖鎖結合に関して決定的な違いを生じさせている。Domain-I の Tyr24 のフェノール環は Trp のインドール環ほどかさ高くはないので、ひとつの糖残基としか相互作用を形成することができない。一方、Domain-II の Tyr63 は、Domain-I ではよりかさ高い側鎖をもつ Trp22 に置換されているが、糖鎖結合部位を取り囲む残基によりコンフォメーションが制限されているため 1 つの糖残基としか相互作用できない。故に、PL-D2 の Domain-I の 24 番目の残基に相当するアミノ酸の側鎖は、糖鎖の結合に重要であるように思われる。

PL-D2 に関して 2 つの糖鎖結合部位における糖鎖結合親和力の違いはまだ報告されていないが、今回の PL-D2 糖鎖複合体と UDA 糖鎖複合体の結晶構造は、それらの 2 つの糖鎖結合部位における結合親和力の違いを反映しているのかもしれない。つまり、結晶生成過程において、まず糖鎖とより強い親和力を有する糖鎖結合部位が最初に 3 つの糖残基に結合し、次に既に糖鎖と結合している他の分子が残った糖鎖結合部位にその糖残基を挟み込むようにして共有することにより、このような無限の分子鎖が生じたのではないかと推察される。

8. 糖鎖の結合方向性

PL-D2 の糖鎖特異性決定因子としての水素結合の役割については既に述べた。本節では、更にこの糖鎖との間に形成される水素結合によって決まる PL-D2 分子に結合した 2 つの糖鎖の結合方向性について考察する。

PL-D2 分子の 2 つのドメインに保存されている Ser および極性芳香族残基と糖鎖の間で形成される水素結合は、結合する糖鎖の特異性を決定していると同時にそ

の方向性も決定している。結合する糖鎖の非還元末端と還元末端を変えた場合、今回の結晶構造で観察されたような各糖残基の 2'位の *N*-アセチル基および C'3 位の水酸基と保存された Ser および極性芳香族環との間に水素結合を形成するようなモデルを作成することはできなくなってしまう。従って、Ser および極性芳香族残基は糖鎖特異性決定因子としての役割を果たしているのと同時に糖鎖の方向を決定付ける役割をも担っている。

図 3.6c が示すように、この水素結合によって方向付けられた PL-D2 の各ドメインに結合している 2 つの糖鎖の相対的位置関係を考えた時、タンパク質との結合に関してこれらは互いに独立であることは明らかである。Domain-I に結合している糖鎖が伸びる方向(非還元末端から還元末端方向; 図中で矢印の方向)と Domain-II に結合している糖鎖のそれは全く関連がない。それ故、三糖より長い直鎖状の多糖との結合を考えたとしても、PL-D2 は 2 つのドメインで 1 つの糖鎖に結合するのではなく、2 つのドメインそれぞれに今回の結晶構造で観察された様式で別々の糖鎖を結合させるものと考えられる。細胞間を架橋する上でも、結合する糖鎖の方向性は重要なのであろうと推測される。

9. タンパク質間および糖鎖-タンパク質間相互作用の類似性

PL-C 二量体中のタンパク質間相互作用と PL-D2 糖鎖複合体中の糖鎖-タンパク質間相互作用の比較に基づき、それらの類似性について詳細に考察する。

PL-C の各ドメイン対(Domain-IA/Domain-IIIB, Domain-IIA/Domain-IIB, Domain-IIIA/Domain-IB)におけるタンパク質間相互作用および PL-D2 糖鎖複合体のタンパク質-糖鎖間相互作用の様式を図 3.13 に示す。PL-C のタンパク質間相互作用において、各々のドメインの糖鎖結合残基が互いに糖鎖をミミックした様に振る舞っているのがわかる。例えば、PL-C の Domain-IIIB に PL-D2 の Domain-II を重ね合わせると、PL-C

の Domain-IIIB と相互作用を形成している Domain-IA の糖鎖結合に関与するとされる芳香族環は、PL-D2 糖鎖複合体の糖残基と重なる。PL-C の Trp22A のインドール環は tri-*N*-acetylchitotriose の還元末端側 NAG-III のピラノース環と完全に重なる。同様に、PL-C の Glu30A の側鎖は NAG-II のピラノース環と重なる。また、PL-D2 の His72 は NAG-II の C'3 位ヒドロキシル基と水素結合を形成しているが、PL-C において NAG-II に相当する位置に Glu30A が位置し、そのカルボニル酸素は相手サブユニットの His113B と水素結合を形成している。また、全てのドメインに保存されている Ser 残基 (Ser20, Ser61, Ser102) は、PL-C 二量体構造において水和している。PL-C 結晶中でこれらの Ser 残基に水素結合している水分子の位置に、PL-D2 糖鎖複合体中では糖残基の *N*-アセチル基のカルボニル酸素が位置して Ser 残基と水素結合を形成している。このように、PL-C の糖鎖結合部位同士によるタンパク質間相互作用は PL-D2 糖鎖複合体の糖鎖-タンパク質間相互作用に非常に類似している。

PL-C の糖鎖結合部位同士の相互作用は、PL-D2 の糖鎖結合部位-糖鎖間の相互作用より接触面の形においてより相補的であると思われる。PL-C の各々の糖鎖結合部位が二量体形成によって失われる溶媒接触面積と PL-D2 の糖鎖結合部位が糖鎖との結合により失われる溶媒接触面積を各残基に対してプロットした図を図 3.14 に示す。この図からも明らかなように、PL-C は PL-D2 の糖鎖結合に関わる残基に相当する残基同士の接触により二量体構造を形成しているのがわかる。しかし、それぞれのタンパク質の相互作用によって失われる糖鎖結合残基の溶媒接触面積は大きく異なっている。糖鎖結合部位同士による接触面積は Domain-IA/Domain-IIIB, Domain-IIA/Domain-IIIB および Domain-IIIA/Domain-B'間ではそれぞれ 705 \AA^2 , 580 \AA^2 および 614 \AA^2 となっている。一方、PL-D2 糖鎖複合体における糖鎖結合部位-糖鎖の接触面積は Domain-I および Domain-II においてそれぞれ 480 \AA^2 , 583 \AA^2 である。明らかに、PL-C 二量体構造の糖鎖結合部位におけるタンパク質間相互作用は、PL-D2 の糖鎖-タンパク質間相互作用より広範囲に及んでいることがわかる。タンパク質間および

糖鎖_タンパク質間相互作用の比較から、PL-C は糖鎖をミミックしたアミノ酸残基の相互作用により、PL-D2 でのタンパク質_糖鎖間相互作用よりもより強い力で自己集合的に二量体構造を形成していることが明らかである。このため、もはや糖鎖と相互作用するための空間はなく、今回得られた PL-C 二量体構造は糖鎖結合活性型構造ではないと考えられる。この構造から、PL-C の赤血球凝集能の欠如は、自身の会合によって糖鎖結合能を失った結果だと考えられる。

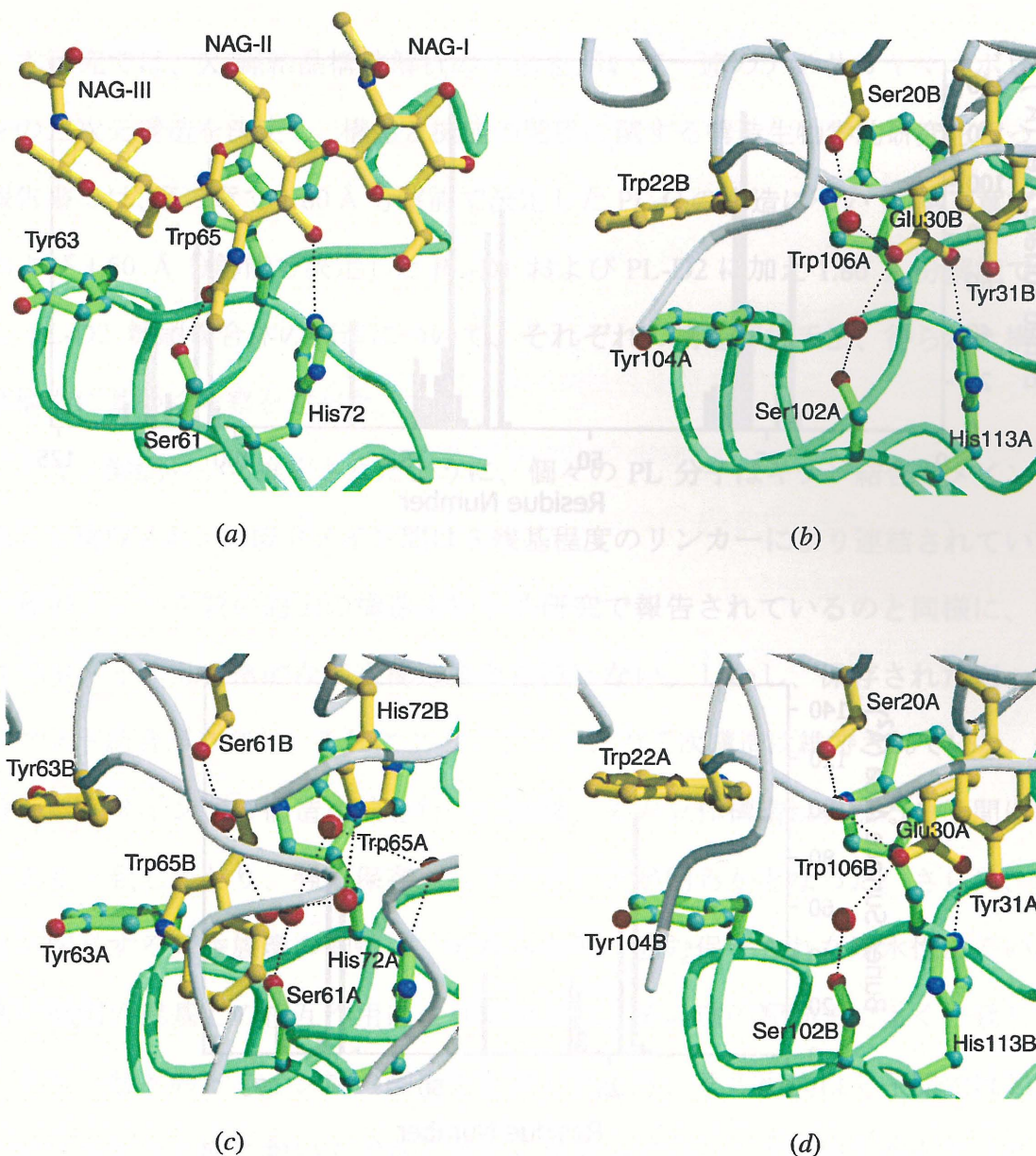


図 3.13 タンパク質間およびタンパク質-糖鎖間相互作用の類似性

(a) PL-D2 糖鎖複合体におけるタンパク質-糖鎖間相互作用

(b-d) PL-C 二量体構造におけるタンパク質間相互作用。(b), (c) および(d) は、それぞれ Domain-IA と Domain-IIIB, Domain-IIA と Domain-IIIB および Domain-IIIA と Domain-IB の接触面における相互作用を示している

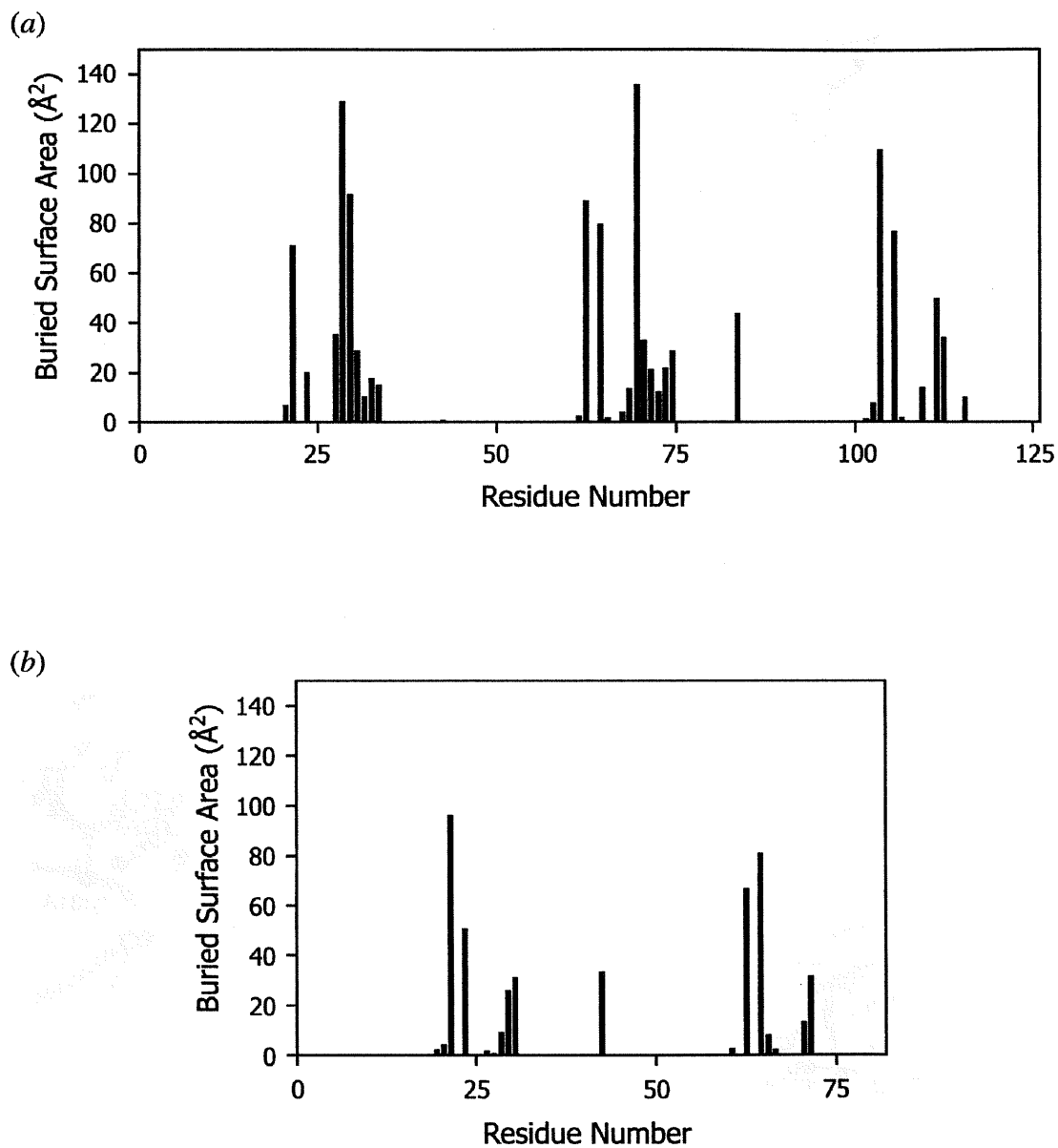


図 3.14 PL-C 二量体形成(a) および PL-D2 糖鎖複合体形成(b)により失われた溶媒接触面積

プローブ半径を 1.4 Å の値に設定し、プログラム CNS⁵⁹ を用いて計算された。

第四章 総括

本研究では、X 線結晶構造解析の手法を用いて一連のアメリカヤマゴボウレクチンの三次元構造を決定し、構造と機能の関係に関する構造生物学的研究を行った。本報告書では、第二章で 1.80 Å 分解能で決定した PL-C の構造について、第三章で 1.65 Å および 1.50 Å 分解能で決定した PL-D1 および PL-D2 に加え 1.80 Å 分解能で決定した PL-D2 糖鎖複合体の構造について、それぞれの構造解析手法、得られた構造および構造に基づく考察を述べた。

アミノ酸配列から推定されたように、個々の PL 分子はキチン結合ドメインの繰り返しで構成され、隣接ドメイン間は 3 残基程度のリンカーにより連結されていた。この種のタンパク質の過去の構造生物学的研究で報告されているのと同様に、それぞれのドメインは特徴的な二次構造要素を持たない。しかし、保存された四つのジスルフィド結合が存在し、それによってドメインの三次構造は維持されている。個々の分子のドメイン間の構造比較を行った結果、その立体構造は異なる分子間に関わらずよく一致しており、強く保存されていることが明らかとなった。さらに、糖鎖結合に関与する芳香族環の側鎖は、それらを取り囲む保存された疎水性あるいはかさ高い側鎖の残基との相互作用により固定され、その環の配向までよく一致していた。また、個々のドメイン間の配向を比較したとき、その配向は分子間では勿論のことサブユニット間においてでさえ大きく異なっていることが明らかとなった。このドメイン間の配向の違いは、結晶中での分子あるいはサブユニットのパッキングの違いに起因する分子間相互作用の違いにより生じたと考えられるが、むしろ、これは隣接ドメイン間を連結するリンカーの柔軟性によるドメイン間の配向の自由度の表れであると考えられる。このような 2 つの相反する性質、すなわちドメイン構造の剛体性とドメイン間を連結するリンカーの柔軟性は、一連の PL 分子の機能発現

に必須であると推察される。つまり、分子表面で細胞表面上のターゲット分子と特異的な相互作用をするために、キチン結合ドメインの構造および糖鎖結合に関与する芳香族環の配向までもが強固に維持される必要がある。さらに、細胞間を架橋し凝集させる上でターゲット分子との相互作用を容易にするためにも、個々のドメインが柔軟なリンカーで連結されていることは理にかなっている。進化の過程で、キチン結合能を獲得したドメイン構造を高く保存しながら、それらを組み合わせることにより生理活性の異なるこれらの PL 分子を生み出してきたのは非常に効率的であると考えられる。

レクチンの中でも生化学的および構造生物学的に最もよく研究されているマメ科由来レクチンに関するこれまでの研究から、基本的には同じでありながらもわずかに異なる種々の変異構造をとるセグメントのドメイン的あるいは四次構造的会合によって構造形成された結果、レクチンは様々な機能を発揮していることが明らかになってきた (Chandra *et al.*, 1999; Hamelryck *et al.*, 2000; Buts *et al.*, 2001)。例えば、マメ科植物 *Dolichos biflorus* 由来レクチンである DB58 と同じ植物の種子由来レクチンである DBL に関して、DBL は赤血球を凝集させるが、DB58 は PL-C と同様にそのような活性を示さないことが知られている (Etzler, 1996)。DBL と DB58 は、マメ科レクチンにおいて立体構造的に保存された 2 つの異なるサブユニットが非共有結合的に組み合わさってヘテロ二量体を形成し、更に、この二量体が非共有結合的に会合することによって四量体を形成している。しかし、DBL はマメ科レクチンで共通に見られる様式で四量体を形成しているが、DB58 は 2 つの二量体が DBL とは全く異なる様式で会合し四量体を形成していることが X 線結晶構造解析により明らかにされ、その四次構造の違いが両者の機能の違いに関係しているのではないかと推測されている (Buts *et al.*, 2001)。このように、レクチンの四次構造を形成するタンパク質間相互作用の重要性が指摘されている。更に、マメ科レクチンでは、薬理的見地から糖鎖をミミックしたペプチド阻害剤の開発も活発に行われている (Kieber-

Emmons, 1998; Qiu *et al.*, 1999)。糖鎖をミミックしたペプチドはレクチンの生物活性を拮抗的に阻害することが生化学的に示され (Oldenburg *et al.*, 1992; Scott *et al.*, 1992; Kaur *et al.*, 1997)、さらにペプチド-レクチン複合体の X 線結晶構造解析も行われ、実際にペプチドがレクチンの糖鎖結合部位に糖鎖と同じような様式で結合することが明らかにされている (Jain *et al.*, 2000, 2001; Ravishankar *et al.*, 2001)。このように、糖鎖との相互作用だけでなくタンパク質あるいはペプチドとの相互作用という点でも、レクチンは注目されてきている。PL に関しても、生理活性アミンであるセロトニン(5-hydroxytryptamine; 5HT)は、PL の生理活性を阻害することが報告されている (Stefulj *et al.*, 2001)。5HT は、構造上 *N*-acetylglucosamine に似ていることから、PL-D2 糖鎖複合体で観察されたのと同じような様式で、5HT のキチン結合ドメインへの結合が可能であることがグラフィックワークステーション上で示された。それ故、5HT による PL の阻害は、PL 分子が結合する細胞表面上のターゲット分子に 5HT が競争的に結合する結果 PL の機能を阻害するのではなく、PL の糖鎖結合部位に 5HT が結合することによって起こるのかもしれない。

一般的に、レクチンは糖鎖に対する結合部位の多価性がその生理活性の高さを決定付けていると考えられている。7つのキチン結合ドメインからなる PL-B や4つのキチン結合ドメインからなるサブユニット同士の会合により二量体構造を形成している WGA は、2つのキチン結合ドメインからなる PL-D2 や UDA より遥かに高い赤血球凝集活性を示す。これは、その結合部位の多さによるものだと考えられる。しかし、3つのキチン結合ドメインからなるサブユニット同士の会合により二量体構造を形成している PL-C は赤血球凝集活性がない。第二章における PL-C の X 結晶構造解析の結果から、糖鎖結合部位で保存された芳香族残基による疎水的相互作用により、PL-C の二量体構造が形成されていることが明らかとなった。また、第三章における PL-D2 糖鎖複合体結晶中で観察された糖鎖-タンパク質間相互作用と PL-C 二量体構造を形成するタンパク質間相互作用の比較から、それらは非常に類似してい

ることが示され、PL-C の二量体構造形成に関与する芳香族残基は糖鎖をミミックしていることが明らかとなった。そのため、PL-C 二量体構造には糖鎖と相互作用を形成しうる空間がない。これらの観測結果から、PL-C が赤血球凝集活性を示さないのは、自身の糖鎖結合残基を介した会合による糖鎖結合部位の遮蔽によるものと解釈できる。

また、レクチンの結合部位の多価性は、細胞間の架橋や凝集を可能にする重要な因子であると考えられている。事実、1 つのキチン結合ドメインタンパク質である Ac-AMPs や Hevein はキチンには結合するが赤血球凝集能をもたない。PL-D2 糖鎖複合体結晶中において、PL-D2 分子は結晶学的対称操作によって関連付けられる隣接分子との間で 1 つの糖鎖を共有し、らせん状の分子鎖を形成していた。このような糖鎖を介して形成される分子鎖は、他の多くのレクチン-糖鎖複合体の X 線結晶構造でも報告されている (Wright *et al.*, 1992; Bourne *et al.*, 1994; Olsen *et al.*, 1997; Harata & Muraki, 2000; Saul *et al.*, 2000)。更に、異なるレクチン-オリゴ糖に対してそれぞれ特徴的な格子パターンが形成されることが電子顕微鏡で観察されている (Gupta & Brewer, 1994; Gupta *et al.*, 1994)。これらのレクチン-糖鎖複合体で観察された複雑な分子間相互作用は、細胞表面上で実際に起こるレクチン-リガンド間の相互作用そのものを表しているとは言えないが、その多様な相互作用を反映しているのではないかと考えられる。

PL-C が赤血球凝集能を示さない理由を、本研究で得られた結晶構造から説明することができた。しかし、PL-C は、なぜ赤血球凝集能がないにも関わらずマイトジェン活性を有するのだろうか？ レクチンは糖結合タンパク質であることから、レクチンの赤血球や細胞に対する凝集活性はその糖結合能によってもたらされていると考えられている。しかし、これまでに研究されてきた数多くのレクチンの中で、マイトジェン活性を持つと報告されたものは数える程しかない。マイトジェン活性を持つものと持たないものの間における糖鎖特異性の違いは当然重要な問題である

が、「糖鎖結合=マイトジェン活性」とは限らないのではないだろうか。実際、同じキチン結合ドメインからなる WGA は、マイトジェンに対するアンタゴニストとして振る舞うことが報告されている (Kilpatrick & McCurrach, 1987)。PL-D1 と PL-D2 に関しても、たった C 末端 2 残基の違いだけで、PL-D2 がマイトジェン活性を示すのに対して PL-D1 は示さないという違いが生じている。今回の PL-D1 結晶構造で C 末端 2 残基を見出すことは残念ながら出来なかったが、その立体構造から恐らく C 末端 2 残基は糖鎖の結合には関与しないと思われる。それ故、糖鎖結合能は赤血球凝集活性と密接な関係があるがマイトジェン活性とはあまり関係がないのではないだろうか。PL 分子は、糖鎖の付加により赤血球凝集活性は阻害されるがマイトジェン活性は阻害されないという実験結果も報告されており (石黒ら、未発表データ)、上記の考えを支持するものと考えられる。

参 考 文 献

- Anantharam, V., Patanjali, S. R., Swamy, M. J. Sanadi, A. R., Goldstein, I. J. & Surolia, A. (1986). Isolation, macromolecular properties, and combining site of a chito-oligosaccharide-specific lectin from the exudate of ridge gourd (*Luffa acutangula*). *J. Biol. Chem.* **261**, 14621–14627.
- Asensio, J. L., Canada, F. J., Bruix, M., Rodriguez-Romero, A. & Jimenez-Barbero, J. (1995). The interaction of hevein with *N*-acetylglucosamine-containing oligosaccharides. Solution structure of hevein complexed to chitobiose. *Eur. J. Biochem.* **230**, 1380–1382.
- Aub, J. C., Tieslan, C. & Lankester, A. (1963). Reactions of normal and tumor cell surfaces to enzymes, I. Wheat-germ lipase and associated mucopolysaccharides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **50**, 613–619.
- Beintema, J. J. & Peumans, W. J. (1992). The primary structure of stinging nettle (*Urtica dioica*) agglutinin. A two-domain member of the hevein family. *FEBS Lett.* **299**, 131–134.
- Bostwick, D. E., Skaggs, M. I. & Thompson, G. A. (1994). Organization and characterization of *Cucurbita phloem* lectin genes. *Plant Mol. Biol.* **26**, 887–897.
- Bourne, Y., Bolgiano, B., Liao, D. I., Stecker, G., Cantau, P., Herzberg, O., Feizi, T. and Cambillau, C. (1994). Crosslinking of mammalian lectin (galectin-1) by complex biantennary saccharides. *Nature Struct. Biol.* **1**, 863–870.
- Britton, D. (1972). Estimation of twinning parameter for twins with exactly superimposed reciprocal lattices. *Acta Cryst.* **A28**, 296–297.
- Broekaert, W., Lee, H., Kush, A., Chua, N. & Raikhel, N. (1990). Wound-Induced Accumulation of mRNA Containing a Hevein Sequence in Laticifers of Rubber Tree (*Hevea brasiliensis*). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 7633–7637.
- Broekaert, W. F., Marien, M., Terras F. R. G., De Bolle, M. F. C., Proost, P., Van Damme, J.,

- Dillen, L., Claeys, M., Rees, S. B. Vanderleyden, J. & Cammue, B. P. A. (1992). Antimicrobial peptides from *Amaranthus caudatus* seeds with sequence homology to the cysteine/glycine-rich domain of chitin-binding proteins. *Biochemistry*, **31**, 4308–4314.
- Broglie, K. E., Gaynor, J. J. & Broglie, R. M. (1986). Ethylene-regulated gene expression: molecular cloning of the genes encoding an endochitinase from *Phaseolus vulgaris*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 6820–6824.
- Brünger, A. T. (1992). X-PLOR, version 3.1. A system for X-ray crystallography and NMR, Yale University Press, New Haven, CT.
- Brünger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J.-S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N. S., Read, R. J., Rice, L. M., Simonson, T. & Warren, G. L. (1998). Crystallography & NMR System: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Cryst. D* **54**, 905–921.
- Buts, L., Dao-Thi, M. H., Loris, R., Wyns, L., Etzler, M. & Hamelryck, T. (2001). Weak protein-protein interactions in lectins: The crystal structure of a vegetative lectin from the legume *Dolichos biflorus*. *J. Mol. Biol.* **309**, 193–201.
- Chan, R. W. (1954). *Adv. Phys.* **3**, 363–445.
- Chandra, N. R., Ramachandraiah, G., Bachhawat, K., Dam, T. K., Surolia, A. & Vijayan, M. (1999). Crystal structure of a dimeric mannose-specific agglutinin from garlic: quaternary association and carbohydrate specificity. *J. Mol. Biol.* **285**, 1157–1168.
- Collaborative Computational Project, Number 4. (1994). The CCP4 suite: Programs for protein crystallography. *Acta Crystallog. sect. D*, **50**, 760–763.
- Cowtan, K. (1994). DM: an automated procedure for phase improvement by density modification. *Joint CCP4 and ESF-EACBM Newslett. Protein Crystallogr.* **31**, 34–38.
- Decastel, M., De Boeck, H., Goussault, Y., De Bruyne, C. K., Loontjens, F. G. & Frenoy, J.-P. (1985). Effect of pH on oligomeric equilibrium and saccharide-binding properties of

- peanut agglutinin. *Arch. Biochem. Biophys.* **240**, 811–819.
- Di Sabato, G., Hall, J.M. & Thompson, L. (1987). T cell mitogens and polyclonal B cell activators. *Methods Enzymol.* **150**, 3–17.
- Drickamer, K. (1995). Multiplicity of lectin-carbohydrate interactions. *Nature struct. Biol.* **2**, 437–439.
- Engh, R. A. & Huber, R. (1991). Accurate bond and angle parameters for X-ray protein structure refinement. *Acta Cryst.* **A47**, 392–400.
- Etzler, M. E. (1996). The *Dolichos biflorus* lectin family: a model system for studying legume lectin structure and function. In *Lectin-Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry* (Van Driessche, E., Rouge, P., Beeckmans, S. & Bog-Hansen, T. C., eds), vol. 11, pp. 3–9, Textop, Denmark.
- Evans, P. R. (1993). Data reduction. In proceedings of CCP4 study weekend on data collection and processing, (Warrington, UK: Daresbury Laboratory), pp. 114–122.
- Farne, P., Barker, B. E. Brownhill, L. E. & Fanger, H. (1964). *Lancet*, **1**, 1100–1101.
- Fish, W. W., Hamlin, L. M. & Miller, R. L. (1978). The macromolecular properties of peanut agglutinin. *Arch. Biochem. Biophys.* **190**, 693–698.
- Fisher, R. G. & Sweet, R. M. (1980). Treatment of diffraction data from crystals twinned by merohedry. *Acta Cryst.* **A36**, 755–760.
- Funatsu, G., Yoshitake, S. & Funatsu, M. (1978). Primary structure of Ile chain of ricin D. *Agric. Biol. Chem.* **42**, 501–503.
- Funatsu, G., Ueno, S. & Funatsu, M. (1978). Subunit structure of castor bean hemagglutinin. *Agric. Biol. Chem.* **41**, 1737–1743.
- Galelli, A. & Truffa-Bachi, P. (1993). *Urtica dioica* agglutinin. A superantigenic lectin from stinging nettle rhizomes. *J. Immunol.* **151**, 1821–1831.
- Gidrol, X., Chrestin, H., Tan, H. L. & Kush A. (1994). Hevein, a lectin-like protein from

- Hevea brasiliensis (rubber tree) is involved in the coagulation of latex. *J. Biol. Chem.* **269**, 9278–9283.
- Gomis-rüth, F. X., Fita, A., Kiefersauer, R., Huber, R., Aviles, F. X. & Navaza, J. (1995). Determination of hemihedral twinning and initial structural analysis of crystals of the procarboxypeptidase A ternary complex. *Acta Cryst.* **D51**, 819–823.
- Gupta, D. & Brewer, C. F. (1994). Homogeneous aggregation of the 14-kDa β -galactoside specific vertebrate lectin complex with asialofetuin in mixed systems. *Biochemistry*, **33**, 5526–5530.
- Gupta, D., Bhattacharyya, L., Fant, J., Macaluso, F., Sabesan, S. & Brewer, C. F. (1994). Observation of unique cross-linked lattices between multiantennary carbohydrates and soybean lectin. Presence of pseudo-2-fold axes of symmetry in complex type carbohydrates. *Biochemistry*, **33**, 7495–7504.
- Halina, L. & Sharon, N. (1998). Lectins: Carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. *Chem. Rev.* **98**, 637–674.
- Hamelryck, T. W., Moore, J. G., Chrispeels, M. J., Loris, R. & Wyns, L. (2000). The role of weak protein–protein interactions in multivalent lectin–carbohydrate binding: Crystal structure of cross-linked FRIL. *J. Mol. Biol.* **299**, 875–883.
- Harata, K. & Muraki, M. (2000). Crystal structures of *Urtica dioica* agglutinin and its complex with tri-N-acetylchitotriose. *J. Mol. Biol.* **297**, 673–681.
- Harata, K., Schubert, W. D. & Muraki, M. (2001). Structure of *Urtica dioica* agglutinin isolectin I: dimer formation mediated by two zinc ions bound at the sugar-binding site. *Acta Crystallog. sect. D*, **57**, 1513–1517.
- Hester, G., Kaku, H., Goldstein, I. J. & Wright, C. S. (1995). Structure of mannose-specific snowdrop (*Galanthus nivalis*) lectin is representative of a new plant lectin family. *Nature struct. Biol.* **2**, 472–479.

- Hester, G. & Wright, C. S. (1996). The mannose-specific bulb lectin from *Galanthus nivalis* (snowdrop) binds mono- and dimannosides at distinct sites. Structure analysis of refined complexes at 2.3 Å and 3.0 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **262**, 516–531.
- Hatakeyama, T., Kohzaki, H., Nagatomo, H. & Yamasaki, N. (1994). Purification and characterization of four Ca^{2+} -dependent lectins from the marine invertebrate, *Cucumaria echinata*. *J. Biochem.* **116**, 209–214.
- Hatakeyama, T., Nagatomo, H. & Yamasaki, N. (1995). Interaction of the hemolytic lectin CEL-III from the marine invertebrate *Cucumaria echinata* with the erythrocyte membrane. *J. Biol. Chem.* **270**, 3560–3564.
- Hayashida, M., Fujii, T., Hamasu, M., Ishiguro, M. & Hata, Y. (2003). Crystallization and preliminary X-ray analysis of lectin C from the roots of pokeweed (*Phytolacca americana*). *Acta Crystallog. sect. D*, **59**, 1249–1252.
- Headley, A. G., Roe, S. M. & Pearl, L. H. (1998). PDBID=1BB5. <http://www.rcsb.org/pdb/cgi/explore.cgi?pid=194171063273744&pdbId=1BB5>
- Hom, K., Gochin, M., Peumans, W. J. & Shine, N. (1995). Ligand-induced perturbations in *Ulrica dioica* agglutinin. *FEBS Letters*, **361**, 157–161.
- Howells, E. R., Phillips, D. C. & Rogers, D. (1950). The probability distribution of X-ray intensities. II. Experimental investigation and the X-ray detection of centres of symmetry. *Acta Cryst.* **3**, 210–214.
- Ishiguro, M., Takahashi, T., Funatsu, G., Hayashi, K. & Funatsu, M. (1964). Biochemical studies on ricin. *J. Biochem.* **55**, 587–592.
- Jain, D., Kaur, K. J., Sundaravadivel, B. & Salunke, D. M. (2000). Structural and functional consequences of peptide_carbohydrate mimicry. *J. Biol. Chem.* **275**, 16098–16102.
- Jain, D., Kaur, K. J. & Salunke, D. M. (2001). Plasticity in protein-peptide recognition: Crystal structures of two different peptides bound to concanavalin A. *Biophysical Journal*,

80, 2912–2921.

- Kabsch, W. (1988). Evaluation of single-crystal X-ray diffraction data from a position-sensitive detector. *J. Appl. Cryst.* **21**, 916–924.
- Kalb, A. J. & Lusting, A. (1968). The molecular weight of concanavalin A. *Biochim. Biophys. Acta.* **168**, 366–367.
- Kaur, K. J., Khurana, S. & Salunke, D. M. (1997). Topological analysis of the functional mimicry between a peptide and a carbohydrate moiety. *J. Biol. Chem.* **272**, 5539–5543.
- Kieber-Emmons, T. (1998). Peptide mimotopes of carbohydrate antigens. *Immunol Res.* **17**, 95–108.
- Kilpatrick, DC. (1999). Mechanisms and assessment of lectin-mediated mitogenesis. *Mol. Biotechnol.* **11**, 55–65.
- Kilpatrick, D. C. & McCurrach, P. M. (1987). The wheat germ agglutinin is mitogenic, non-mitogenic and anti-mitogenic for human lymphocytes. *Scand. J. Immunol.* **25**, 343–348.
- Kim, M., Rao, M. V., Tweardy, D. J., Praksh, M., Galili, U. & Gorelik, E. Lectin-induced apoptosis of tumour cells. (1993). *Glycobiology*, **3**, 447–453.
- Kimura, Y., Yamaguchi, K. & Funatsu, G. (1996). Structural analysis of N-linked oligosaccharide of mitogenic lectin-B from the roots of pokeweed (*Phytolacca Americana*). *Biosci. Biotech. Biochem.* **60**, 537–540.
- Kino, M., Yamaguchi, K., Umekawa, H. & Funatsu, G. (1995). Purification and characterization of three mitogenic lectins from the roots of pokeweed (*Phytolacca Americana*). *Biosci. Biotech. Biochem.* **59**, 683–688.
- Kleywegt, G. J. & Jones, T. A. (1996). Phi/psi-chology: Ramachandran revisited. *Structure*, **4**, 1395–1400.
- Koch, E. (1992). *International Tables for Crystallography, Vol. C.* pp. 10–14. Dordrecht: Kuwer Academic Publishers.

- Laskowski, R. A. (1993). *PROCHECK*: A program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Crystallog.* **26**, 283–291.
- Lee, R. T., Gabius, H. J. & Lee, Y. C. (1998). Thermodynamic parameters of the interaction of *Ultica dioica* agglutinin with N-acetylglucosamine and its oligomers. *Glycoconjugate J.* **15**, 649–655.
- Leslie, A. G. W. (1992). Joint CCP4 and EESF-EACMB Newsletter on Protein Crystallography. (Warrington, UK: SERC Daresbury Laboratory).
- Liener, IE., Sharon, N. & Irwin J. Goldstein, II. (1986). The Lectins : properties, functions, and applications in biology and medicine. Orlando, Fla. ; Tokyo : Academic Press.
- Lim, B. O., Yamada, K. & Sugano, M. (1994). Effects of bile acids and lectins on immunoglobulin production in rat mesenteric lymph node lymphocytes. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* **30A**, 407–413.
- Luzzati, V. (1952). Traitement statistique des erreurs dans la determination des structures cristallines. *Acta Cryst.* **5**, 802–810.
- Matthews, B. W. (1968). Solvent content of protein crystals. *J. Mol. Biol.* **33**, 491–497.
- Matthews, R., Redinbo, M. R. & Yeates, T. O. (1993). Structure determination of plastocyanin from a specimen with a hemihedral twinning fraction of one-half. *Acta Cryst.* **D49**, 375–380.
- McRee, D.E. A visual protein crystallographic software system for X11/XView. (1992). *J. Mol. Graph.* **10**, 44–46.
- Monsigny, M., Roche, A. C. Sene, C., Maget_Dana, R. & Delmotte, F. (1980). Sugar–lectin interactions: How does wheat-germ agglutinin bind sialoglycoconjugates? *Eur. J. Biochem.* **104**, 147–153.
- Montfort, W., Villafranca, J. E. Monzingo, A. F., Ernst, S. R. Katzin, B., Rutenber, E., Xuong, N. H., Hamlin, R. & Robertus, J. D. (1987). The three-dimensional structure of ricin at 2.8

- Å. *J. Biol. Chem.* **262**, 5398–5403.
- Murray-Rust, P. (1973). The crystal structure of $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]_4\text{Cu}_5\text{Cl}_{17}$: a twinned cubic crystal. *Acta Cryst.* **B29**, 2559–2566.
- Nagata, Y. & Burger, M. (1974). Wheat germ agglutinin. Molecular characteristics and specificity for sugar binding. *J. Biol. Chem.* **249**, 3116–3122.
- Nicolson, G. L., Blaustein, J. & Etzler, M. E. (1974). Characterization of two plant lectins from *Ricinus communis* and their quantitative interaction with a murine lymphoma. *Biochemistry*, **13**, 196–204.
- Nowell, P. C. (1960). Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of human leukocytes. *Cancer Res.* **20**, 362–426.
- Oldenburg, K. R., Loganathan, D., Goldstein, I. J., Schultz, P. G. & Gallop, M. A. (1992). Peptide ligands for a sugar-binding protein isolated from a random peptide library. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 5593–5597.
- Olsen L. R., Dessen, A., Guputa, D., Sabesam, S., Sacchettini, J. C. & Brewer, C. F. (1997). X-ray crystallographic studies of unique cross-linked lattices between four isomeric biantennary oligosaccharides and soybean agglutinin. *Biochemistry*, **36**, 15073–15080.
- Otwinowski, Z. (1991). Maximum likelihood refinement of heavy atom parameters. In isomorphous replacement and anomalous scattering, W. Wolf, P. R. Evans, and A. G. W. Leslie, eds. (Daresbury, UK: science and engineering research council), pp. 80–86.
- Otwinowski, Z. & Minor W. (1997). Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol.* **277**, 307–326.
- Peacock, JS., Colsky, AS. & Pinto, VB. (1990). Lectins and antibodies as tools for studying cellular interactions. *J. Immunol. Methods*, **126**, 147–157.
- Peumans, W. J., De Ley, M. & Broekaert, W. F. (1994). An unusual lectin from stinging nettle (*Urtica dioica*) rhizomes. *FEBS Letters*, **177**, 99–103.

- Qiu, J., Luo, P., Wasmund, K., Steplewski, Z. & Kieber-Emmons, T. (1999). Towards the development of peptide mimotopes of carbohydrate antigens as cancer vaccines. *Hybridoma*, **18**, 103–112.
- Raikhel, N. V. & Lee, H. I. (1993). Structure and function of chitin-binding proteins. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **44**, 591–615.
- Ramachandran, G. N. & Sasisekharan, V. (1968). Conformation of polypeptide and proteins. *Adv. Protein Chem.* **23**, 283–437.
- Ravishankar, R., Thomas, C. J., Suguna, K., Surolia, A. & Vijayan, M. (2001). Crystal structures of the peanut lectin_lactose complex at acidic pH: Retention of unusual quaternary structure, empty and carbohydrate bound combining site, molecular mimicry and crystal packing directed by interactions at the combining site. *Proteins*, **43**, 260–270.
- Redinbo, M. R., Cascio, D., Choukair, M. K., Rice, D., Merchant, S. & Yeates, T. O. (1993). The 1.5-Å crystal structure of plastocyanin from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochemistry*, **32**, 10560–10567.
- Saul, F. A., Rovira, P., Boulot, G., Damme, E.J., Peumans, W. J., Truffa-Bachi, P. & Bentley, G. (2000). Crystal structure of *Urtica dioica* agglutinin, a superantigen presented by MHC molecules of class I and class II. *Structure*, **8**, 593–603.
- Scott, J. K., Loganathan, D., Easley, R. B., Gong, X. & Goldstein, I. J. (1992). A family of concanavalin A-binding peptides from a hexapeptide epitope library. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 5398–5402.
- Sharon, N. & Lis, H. (1990). Legume lectins--a large family of homologous proteins. *FASEB J.* **4**, 3198–3208.
- Shibuya, N., Goldstein, I. J., Shafer, J. A., Peumans, W. J. & Broekaert, W. F. (1986). Carbohydrate binding properties of the stinging nettle (*Urtica dioica*) rhizome lectin. *Arch. Bioch. Bioph.* **249**, 215–224.

- Stefulj, J., Cicin-Sain, L., Schauenstein, K. & Jemej, B. (2001). Serotonin and immune response: effect of the amine on in vitro proliferation of rat lymphocytes. *Neuroimmunomodulation*, **9**, 103–108.
- Transue, T. R., Smith, A. K., Mo, H., Goldstein, I. J. & Saper, M. A. (1997). Structure of benzyl T-antigen disaccharide bound to *Amaranthus caudatus* agglutinin. *Nature struct. Biol.* **26**, 779–783.
- Vagin, A. & Teplyakov, A. (1997). MOLREP: an automated program for molecular replacement. *J. Appl. Cryst.* **30**, 1022–1025.
- Van Parijs, J., Broekaert, W. F., Goldstein, I. J. & Peumans, W. J. (1991). Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. *Planta*, **183**, 258–264.
- Wallace, A. C., Laskowski, R. A. & Thornton, J. M. (1995). LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein Eng.* **8**, 127–134.
- Waxdal, M. J. (1974). Isolation, characterization, and biological activities of five mitogens from pokeweed. *Biochemistry*, **13**, 3671–3677.
- Waxdal, M. J. & Basham, T. Y. (1974). B and T-cell stimulatory activities of multiple mitogens from pokeweed. *Nature*, **251**, 163–164.
- Weis, W., Brown, J. H., Cusack, S., Paulson, J. C., Skehel, J. J. & Wiley, D. C. (1988). Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid. *Nature*, **333**, 426–431.
- Wilson, A. J. C. (1949). The probability distribution of X-ray intensities. *Acta Cryst.* **2**, 318–321.
- Wright, C. S. (1980). Crystallographic elucidation of the saccharide binding mode in wheat germ agglutinin and its biological significance. *J. Mol. Biol.* **141**, 267–291.
- Wright, C. S. (1984). Structural comparison of the two distinct sugar binding sites in wheat germ agglutinin isolectin II. *J. Mol. Biol.* **178**, 91–104.

- Wright, C. S. (1987). Refinement of crystal structure of wheat germ agglutinin isolectin 2 at 1.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **194**, 501–529.
- Wright, C. S. (1989). Comparison of the refined crystal structures of two wheat germ isolectins. *J. Mol. Biol.* **209**, 475–487.
- Wright, H. T., Sandrasegaram, G. & Wright, C. S. (1991). Evolution of a family of N-acetylglucosamine binding proteins containing the disulfide-rich domain of wheat germ agglutinin. *J. Mol. Evol.* **33**, 283–294.
- Wright, C. S. (1992). Crystal structure of a wheat germ agglutinin/glycophorin-sialoglycopeptide receptor complex. *J. Biol. Chem.* **267**, 14345–14352.
- Wright, C. S. & Jaeger, J. (1993). Crystallographic refinement and structure analysis of the complex of wheat germ agglutinin with a bivalent sialoglycopeptide from glycophorin A. *J. Mol. Biol.* **231**, 620–638.
- Yamagami, T & Funatsu, G. (1994). The complete amino acid sequence of chitinase-a from the seeds of rye (*Secale cereal*). *Biosci. Biotech. Biochem.* **58**, 322–329.
- Yamaguchi, K., Mori, A. & Funatsu, G. (1995). The complete amino acid sequence of lectin-C from the roots of pokeweed (*Phytolacca Americana*). *Biosci. Biotech. Biochem.* **59**, 1384–1385.
- Yamaguchi, K., Mori, A. & Funatsu, G. (1996). Amino acid sequence and some properties of lectin-D from the roots of pokeweed (*Phytolacca Americana*). *Biosci. Biotech. Biochem.* **60**, 1380–1382.
- Yamaguchi, K., Yurino, N., Kino, M., Ishiguro, M. & Funatsu, G. (1997). The amino acid sequence of mitogenic lectin-B from the roots of pokeweed (*Phytolacca Americana*). *Biosci. Biotech. Biochem.* **61**, 690–698.
- Yeates, T. O. (1988). Simple statistics for intensity data from twinned specimens. *Acta Cryst.* **A44**, 142–144.

- Yeates, T. O. (1997). Detecting and overcoming crystal twinning. *Methods Enzymol.* **276**, 344–358.
- Yokoyama, K., Yano, O., Terao, T. & Osawa, T. (1976). Purification and biological activities of pokeweed (*Phytolacca Americana*). *Biochim. Biophys. Acta.* **427**, 443–452.
- Zhu, Q. & Lamb, C. J. (1991). Isolation and characterization of a rice gene encoding a basic chitinase. *Mol. Gen. Genet.* **226**, 289–296.

和文・書籍

- 山口健一 (1997) 九州大学博士論文
- 山本一夫著 (1994). 生化学、第 66 卷、111–1129
- ナタン・シャロン, ハリナ・リス著 ; 大沢利昭, 小浪悠紀子訳 (1990). レクチン 東京 : 学会出版センター